



Marisa Alves Cristóvão Paulino

Licenciada em Química Aplicada – Química Orgânica

**Isolamento e identificação de isoprenóides
híbridos e macrólidos bioativos de
Streptomyces aculeolatus obtidas de
sedimentos oceânicos provenientes do
Arquipélago da Madeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Doutora Susana P. Gaudêncio
Investigadora Auxiliar, REQUIMTE, LAQV, Departamento de
Química e UCIBIO, Departamento de Ciências da Vida –
FCT/UNL

Co-orientador: Doutora Florbela Pereira
Investigadora Pós-Doc, REQUIMTE, LAQV, Departamento de
Química– FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço

Arguente: Doutor Nelson Gonçalo Mortágua Gomes

Vogal: Doutora Susana Maria Pereira Gaudêncio de Matos

Marisa Alves Cristóvão Paulino

Licenciada em Química Aplicada – Química Orgânica

**Isolamento e identificação de isoprenóides
híbridos e macrólidos bioativos de
Streptomyces aculeolatus obtidas de
sedimentos oceânicos provenientes do
Arquipélago da Madeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Bioorgânica

Orientador: Doutora Susana P. Gaudêncio
Investigadora Auxiliar, REQUIMTE, LAQV, Departamento de
Química e UCIBIO, Departamento de Ciências da Vida –
FCT/UNL

Co-orientador: Doutora Florbela Pereira
Investigadora Pós-Doc, REQUIMTE, LAQV, Departamento de
Química– FCT/UNL

Setembro 2016

Copyright © Marisa Alves Cristóvão Paulino, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

- *Aos meus pais por me terem permitido escolher os meus próprios caminhos.*

- *Aos meus primos, Rita e Rui, por me ajudarem a segui-los.*

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Doutora Susana Gaudêncio e Doutora Florbela Pereira por todos os ensinamentos, pela paciência e, sobretudo pela oportunidade de crescimento académico e pessoal.

Relativamente às análises de RMN, quero agradecer à Ana Teresa por toda a disponibilidade e simpatia. Ao Prof. Eurico Cabrita (Rede RMN FCT-UNL). À Fundação para a Ciência e Tecnologia (RECI/BBB-BQB/0230/2012) pelo financiamento à *The National NMR Facility*, da qual fazem parte os equipamentos de RMN utilizados.

À Cynthia e à Prof. Doutora Ilda Sanches (FCT-UNL) pelo apoio e auxílio na realização dos ensaios biológicos antibacterianos.

Às Professoras Isabel Cunha (CIIMAR), Rita Sobral (FCT-UNL), Susana Gonçalves (IPS) e Cecília Rodrigues (FFUL) pela realização dos ensaios biológicos de *antifouling*, antibiofilme clínico e marinho, e anticancerígeno, respetivamente.

À Professora Teresa Barros, à Cláudia e ao André do laboratório 305 um agradecimento muito especial não só pelo apoio à realização das medições de rotação ótica, mas também pela forma como me “acolheram”.

Ao Professor W. Fenical, Doutor P. R. Jensen e Christopher Kauffman do *Scripps Institution of Oceanography*, CA, USA, pelo apoio prestado na execução da colheita de amostras. À Professora P. Castilho da Universidade da Madeira e M. Freitas da Estação de Biologia Marinha, Funchal, Portugal, pelo apoio logístico durante a expedição.

Aos meus colegas que realizaram os seus trabalhos no âmbito do projeto Tesouros Oceânicos, Sara Cruz, Fredilson Melo, Helena Macedo, Sofia Silva, Ana Fernandes, Ana Amendoeira e Lígia Costa por todo o apoio logístico, pelas brincadeiras e suporte emocional. Ao Mestre Tiago Dias pela disponibilidade, pelas dicas e amizade demonstrada ao longo deste ano. Aos meus colegas e amigos do laboratório que diariamente conviveram comigo durante a realização desta tese: Edgar Teixeira, Sara Purificação, Marina Pires, Cátia Santos, Patrícia Máximo e Margarida Figueiredo.

Um agradecimento muito especial à minha vizinha de bancada, Daniela Peixoto, por toda a amizade demonstrada, pelos conselhos, pela paciência, por me ter deixado ocupar a bancada dela quando não havia espaço na minha, mas acima de tudo um obrigada por acreditar em mim.

Ao Rúben por todos os *coffees breaks* ao longo deste ano.

Aos meus pais e ao resto da minha família por me terem apoiado durante este ano.

A três pessoas muito especiais, Vânia Silva, Nivalda Raimunda e Filipe Peixoto, com quem partilhei os melhores momentos durante este ano.

Às minhas colegas de casa, Vanessa Sofia, Iana Lychko e Regina Silvestre, por todo o apoio e compreensão prestados nos últimos tempos e, principalmente por não desistirem de me fazer rir.

O financiamento concedido pela FCT / MEC e FEDER ao projeto Tesouros Oceânicos, ref PTDC / QUIQUI / 119116/2010 e IF / 00700/2014, O financiamento do 7º Programa-Quadro da União

Europeia (FP7 / 2007-2013) ao abrigo do contrato de concessão PCOFUND-GA-2009-246.542 e 269.138-NanoGuard.

Este trabalho foi apoiado pelas unidades de investigação LAQV e UCIBIO, que são financiadas por fundos nacionais da FCT / MEC (UID / QUI / 50006/2013 e UID / Multi / 04378/2013, respectively e co-financiado pelo FEDER no âmbito do PT2020 acordo de parceria POCI-01-0145-FEDER - 007.265 e POCI-01-0145-FEDER-007728, respectivamente.

Resumo

A biodiversidade dos oceanos é muito superior à terrestre, sendo que desde 2008 mais de mil compostos de origem marinha foram descobertos anualmente. Devido à peculiaridade dos ecossistemas marinhos os compostos apresentam estruturas químicas únicas e de elevada atividade biológica, com interesse relevante no desenvolvimento de novos medicamentos.

De entre os organismos marinhos destacam-se as actinobactérias. Estas são os procariontes mais valiosos a nível económico e biotecnológico, salientando-se o género *Streptomyces*. Este trabalho focou-se no isolamento e identificação de metabolitos secundários de uma estirpe *S. aculeolatus*, designada PTM-420, pertencente à linhagem MAR4, obtida de sedimentos oceânicos recolhidos no Arquipélago da Madeira.

Para tal procedeu-se à inoculação e crescimento da estirpe PTM-420, extração dos metabolitos produzidos pela mesma, isolamento de 109 compostos por técnicas cromatográficas e avaliação da sua atividade antibacteriana contra MRSA COL (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e VRE EF82 (*Enterococcus faecium* resistente à vancomicina).

Dos 104 compostos testados, 31 e 38 revelaram actividade antimicrobiana contra MRSA COL e VRE EF82, respetivamente, apresentando gamas de concentração mínima inibitória (MIC) de 250 a 1,95 µg/mL.

Os metabolitos secundários que revelaram interesse biológico foram, posteriormente elucidados por técnicas espectroscópicas de RMN 1D e 2D e espectrometria de massa HR-MS. As técnicas de RMN 2D utilizadas foram: COSY (*Correlation Spectroscopy*), TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), 1-1-Adequate, NOESY (*nuclear Overhauser effect*), HSQC-TOCSY-editado e H2BC (*Heteronuclear Two Bond Correlation*).

Deste trabalho resultou a elucidação de seis estruturas pertencentes à família napiradiomicina. Estas estruturas revelaram atividade inibitória contra biofilmes marinhos produzidos pela estirpe *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* superior a 60%. Foi também descoberta uma família de 8 macrólidos, potencialmente novos, cuja estrutura se encontra parcialmente elucidada, e que revelaram atividade superior a 60% contra biofilmes clínicos produzidos por *S. aureus*.

Palavras-chave: metabolitos secundários, actinobactérias, *Streptomyces aculeolatus*, MAR4, isoprenóides híbridos, MRSA COL, VRE EF82

Abstract

The biodiversity of the oceans is much higher compared to the terrestrial and since 2008 one thousand compounds from marine origin were discovered per year. Due to the peculiarity of marine ecosystems, compounds have unique structures and high biological activity, with significant interest in the development of new drugs.

Actinobacteria stand out from all the other marine organisms. These are the most valuable prokaryotes at an economic and biotechnological level, especially actinobacteria from the genus *Streptomyces*. The aim of this work was the isolation and identification of secondary metabolites of a *Streptomyces aculeolatus* strain, designated PTM-420. This strain belonging to MAR4 lineage, was obtained from ocean sediments collected in the Madeira Archipelago.

To attain the purposed goal of this study strain PTM-420 was inoculated and grown for the extraction of its metabolites. Chromatographic techniques were used to isolate 109 compounds, and these have been evaluated for antibacterial activity against MRSA COL (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) and VRE EF82 (*Vancomycin-resistant Enterococcus faecium*) was assessed.

From the 104 compounds, 31 and 38 had shown antibacterial activity against MRSA COL and VRE EF82, respectively, with MIC ranging from 250 to 1,95 µg/mL.

The secondary metabolites that revealed biological interest were elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopic techniques and HR-MS mass spectrometry. The 2D NMR techniques used were COSY (Correlation Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), 1-1-Adequate, NOESY (nuclear Overhauser effect), HSQC-TOCSY-edited and H2BC (Heteronuclear Two Bond Correlation).

From this work six napyradiomycin structures were elucidated with over 60% of biofilm inhibition against the strain *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. It was also discovered a family of 8 macrolides, with the potential of being new, but the structural elucidation is not yet completed. This compounds revealed activity against clinical biofilms of *S. aureus*, with over 60% of inhibition.

Key-words: secondary metabolites, actinobacteria, *Streptomyces aculeolatus*, MAR4, hybrid isoprenoids, MRSA COL, VRE EF82

Índice

i.	Introdução.....	23
1.	Microrganismos terrestres como fonte de produtos naturais	3
2.	Exploração de Ambientes marinhos.....	4
2.1.	Metabolitos produzidos por organismos marinhos.....	5
3.	Actinobactérias marinhas	7
3.1.	Género <i>Streptomyces</i> – MAR4	8
4.	Isoprenóides Híbridos.....	9
4.1.	Biossíntese de Isoprenóides Híbridos	10
4.2.	Isoprenóides híbridos produzidos pela linhagem MAR4.....	12
4.2.1.	Napiradiomicinas	13
4.2.2.	Marinonas	15
4.2.3.	Nitropirrolinas	17
4.2.4.	Fenazinas	19
4.2.5.	Azamerona	20
5.	Macrólidos produzidos pelo género <i>Streptomyces</i>	21
6.	Atividade biológica.....	22
6.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à meticilina (MRSA)	22
6.2.	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina (VRE)	23
6.3.	Atividade anticancerígena	23
6.4.	Atividade Anti-biofilme	24
6.5.	Atividade anti-Incrustante	24
7.	Contextualização e objectivos	26
ii.	Métodos e Materiais	27
1.	Materiais	29
1.1.	Solventes e Reagentes	29
1.2.	Instrumentação	30
2.	Colheita, Identificação, Cultivo e Extração da estirpe PTM-420	31
3.	Fracionamento do crude.....	31
4.	Isolamento dos metabolitos secundários por HPLC	32
5.	Avaliação da atividade biológica das frações e compostos isolados	32
6.	Determinação de Outras atividades biológicas dos compostos.....	34
7.	Técnicas de RMN usadas	34
iii.	Resultados e Discussão	37
1.	Fracionamento do crude: massa e atividades biológicas	39
2.	Isolamento dos compostos por HPLC	40
2.1.	Frações 2+3: massas e atividades biológicas dos compostos isolados	40

2.2.	Fração 4: massas e atividades biológicas dos compostos isolados	42
2.3.	Fração 5: massas e atividades biológicas dos compostos isolados	44
2.4.	Fração 6: massas e atividades biológicas dos compostos isolados	46
2.5.	Fração 7: massas e atividades biológicas dos compostos isolados	48
2.7.	Fração 8+9: massas e atividades biológicas dos compostos isolados	50
3.	Dados espectroscópicos e espectrométricos dos compostos	52
3.1.	PTM-420-F2+F3+F20.....	52
3.2.	PTM-420-F2+F3-F35.....	53
3.3.	PTM-420-F2+F3-F22.....	53
3.4.	PTM-420-F2+F3-F39.....	54
3.5.	Família de macrólidos	56
4.	Elucidação estrutural de Isoprenóides híbridos: napiradiomicinas	59
4.1.	PTM-420-F2+F3-F20.....	59
4.2.	PTM-420-F2+F3-F35.....	63
4.3.	PTM-420-F2+F3-F22.....	67
4.4.	PTM-420-F2+F3-F39.....	71
5.	Elucidação estrutural de Macrólidos	78
5.1.	Composto PTM-420-F4-F15	78
iv.	Conclusões	89
v.	Perspetivas Futuras.....	91
vi.	Bibliografia.....	93
vii.	Anexos.....	97
1.	Estruturas produzidas por <i>S. aculeolatus</i> reportadas	97
2.	Cromatogramas obtidos da estirpe PTM-420	105
3.	Espectros PTM-420-F2+F3-F20.....	107
4.	Espectros PTM-420-F2+F3-F35.....	113
5.	Espectros PTM-420-F2+F3-F22.....	119
6.	Espectros PTM-420-F4-F25	124
7.	Espectros PTM-420-F2+F3-F39.....	130
8.	Espectros PTM-420-F4-F15	136
9.	Espectros PTM-420-F5-F31	143
10.	Espectros PTM-420-F5-F38	147
11.	Espectros PTM-420-F5-F42	149
12.	Espectros PTM-420-F5-F43	151
13.	Espectros PTM-420-F5-F44	157
14.	Espectros PTM-420-F5-F45	159
15.	Espectros PTM-420-F5-F47	161
16.	Cromatograma PTM-420-F5, 2º. Crude	163

17.	Espectros PTM-420-F5, 2º. crude	163
17.1.	Composto PTM-420-F5-F31(2)	163
17.2.	Composto PTM-420-F5-F43(2)	164
17.3.	Composto PTM-420-F5-F45(2)	165

Índice de figuras

Figura i-1 - Variação do número de compostos marinhos descobertos entre 1985 e 2012	4
Figura i-2 – Quantidade e proporção de estruturas bioativas produzidas nas classes de compostos	5
Figura i-3 – Análise da bioatividade dos compostos de acordo com a estrutura química. (PHVD: *Prevention of heart and vascular disease, ** PN/NT: Protection of neurons/neurotoxicity)	6
Figura i-4 – Quantidade e proporção de compostos ativos/ inativos produzidos por espécies das três classes de organismos marinhos	6
Figura i-5 – Relações filogenéticas entre as várias linhagens, designadas “MAR”	9
Figura i-6 – Estruturas de isoprenóides híbridos produzidos por actinobactérias , fragmento terpénico destacado a vermelho.	10
Figura i-7 - Formação das cadeias de terpenóides a partir do IPP e do DMAPP	11
Figura i-8 – Exemplos de isoprenóides híbridos e a sua biossíntese, fragmento terpénico destacado a vermelho	11
Figura i-9 - Classes de isoprenóides híbridos produzidos na linhagem MAR4, Fragmento terpénico destacado a vermelho	12
Figura i-10 - Estruturas da família das napiradiomicinas , fragmento terpénico destacado a vermelho.....	13
Figura i-11 – Perfil UV da família napiradiomicina	13
Figura i-12 – Via biossintética proposta para as napiradiomicinas	14
Figura i-13 – Séries A e B de marinonas	15
Figura i-14 – Proposta biossintética de um tipo de marinona	16
Figura i-15 – Perfil UV da família marinona	16
Figura i-16 – Compostos heranopirroles e nitropirrolinas	17
Figura i-17 – Proposta biossintética para nitropirrolenos	18
Figura i-18 – Perfil UV característico da família nitropirrolina	18
Figura i-19 – Estruturas de lavanducianina e marinofenazina B	19
Figura i-20 – Proposta para a formação do anel 1-hidro-hifenazina	19
Figura i-21 - Azamerona.....	20
Figura i-22 – Exemplos de macrólidos produzidos pelo género <i>Streptomyces</i>	21
Figura ii-1 - Volumes das culturas bacterianas, compostos testados, solução de DMSO e solução de vancomicina colocados nas placas de 96 poços.....	33
Figura iii-1 – Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F20	59
Figura iii-2 – Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F35	63
Figura iii-3 – Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F22	67
Figura iii-4 - Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F39A.....	72
Figura iii-5 – Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F39B.....	75

Figura iii-6 – Possíveis subunidades identificados para as estruturas dos macrólidos	80
Figura iii-7 – Proposta para a estrutura PTM-420-F4-F15.....	86
Figura vii-1 – Cromatograma F2+F3. Compostos isolados e tempos de retenção	105
Figura vii-2 - Cromatograma F4. Compostos isolados e tempos de retenção	105
Figura vii-3 - Cromatograma F5. Compostos isolados e tempos de retenção	105
Figura vii-4 - Cromatograma F7. Compostos isolados e tempos de retenção	106
Figura vii-5 - Cromatograma F6. Compostos isolados e tempos de retenção	106
Figura vii-6 - Cromatograma F8+9. Compostos isolados e tempos de retenção	106
Figura vii-7 - Perfil UV do composto PTM-420-F2+F3-F20	107
Figura vii-8 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	107
Figura vii-9 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	108
Figura vii-10 – Espectro ^{13}C DEPT 135 do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	108
Figura vii-11 - Espectro ^{13}C DEPT 90 do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	109
Figura vii-12 - Espectro COSY do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	109
Figura vii-13 - Espectro TOCSY do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	110
Figura vii-14 - Espectro HSQC do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	110
Figura vii-15 - Espectro HMBC do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	111
Figura vii-16 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	111
Figura vii-17 – Espectro de massa HR-ESI-MS do composto PTM-420-F2+F3-F20.....	112
Figura vii-18 – Espectro de IV do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3	112
Figura vii-19 – Perfil UV do composto PTM-420-F2+F3-F35.....	113
Figura vii-20 - Espectro ^1H do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3	113
Figura vii-21 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3	114
Figura vii-22 - Espectro ^{13}C DEPT 135 do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3	114
Figura vii-23 - Espectro ^{13}C DEPT 90 do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3	115
Figura vii-24 - Espectro COSY do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3	115
Figura vii-25 - Espectro TOCSY do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3	116
Figura vii-26 - Espectro HSQC do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3	116
Figura vii-27 - Espectro HMBC do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3	117
Figura vii-28 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3	117
Figura vii-29 – Espectro de massa HR-ESI-MS do composto PTM-420-F2+F3-F35.....	118
Figura vii-30 – Espectro de IV do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3	118
Figura vii-31 – Espectro UV do composto PTM-420-F2+F3-F22.....	119
Figura vii-32 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3	119
Figura vii-33 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3	120
Figura vii-34 – Espectro COSY do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3	120
Figura vii-35 – Espectro TOCSY do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3	121
Figura vii-36 – Espectro HSQC-editado do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3	121

Figura vii-37 – Espectro HMBC do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl ₃	122
Figura vii-38 – Espectro NOESY do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl ₃	122
Figura vii-39 – Espectro de massa HR-ESI-MS do composto PTM-420-F2+F3-F22.....	123
Figura vii-40 – Espectro IV do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CHCl ₃	123
Figura vii-41 – Espectro UV do composto PTM-420-F4-F25.....	124
Figura vii-42 – Espectro ¹ H para o composto PTM-420-F4-F25, em CDCl ₃	124
Figura vii-43 - Espectro ¹³ C para o composto PTM-420-F4-F25, em CDCl ₃	125
Figura vii-44 - Espectro ¹³ C DEPT 135 para o composto PTM-420-F4-F25, em CDCl ₃	125
Figura vii-45 – Espectro COSY do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl ₃	126
Figura vii-46 – Espectro TOCSY do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl ₃	126
Figura vii-47 - Espectro HSQC do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl ₃	127
Figura vii-48 - Espectro HMBC do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl ₃	127
Figura vii-49 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl ₃	128
Figura vii-50 – Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-2+F3-F25.....	128
Figura vii-51 – Espectro IV do composto PTM-420-2+F3-F25, em CHCl ₃	129
Figura vii-52 – Perfil UV do composto PTM-420-F2+F3-F39.....	130
Figura vii-53 - Espectro ¹ H do composto PTM-420-F2+F3-F39, em CHCl ₃	130
Figura vii-54 - - Espectro ¹³ C do composto PTM-420-F2+F3-F39, em CHCl ₃	131
Figura vii-55 - Espectro ¹³ C DEPT 135 para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl ₃ ..	131
Figura vii-56 - Espectro ¹³ C DEPT 90 para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl ₃	132
Figura vii-57 - Espectro COSY para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl ₃	132
Figura vii-58 - Espectro TOCSY para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl ₃	133
Figura vii-59 - Espectro HSQC para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl ₃	133
Figura vii-60 - Espectro HMBC para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl ₃	134
Figura vii-61 - Espectro NOESY para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl ₃	134
Figura vii-62 - Espectro IV para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CHCl ₃	135
Figura vii-63 - Espectro HR-ESI-MS para o composto PTM-420-F2+F3-F39.....	135
Figura vii-64 – Espectro UV do composto PTM-420-F4-F15.....	136
Figura vii-65 - Espectro ¹ H do composto PTM-420-F4-F15, em CDCl ₃	136
Figura vii-66 - Espectro ¹³ C do composto PTM-420-F4-F15, em CDCl ₃	137
Figura vii-67 - Espectro HSQC-editado do composto PTM-420-F4-F15, em CDCl ₃	137
Figura vii-68 - Espectro COSY do composto PTM-420-F4-F15, CDCl ₃	138
Figura vii-69 - Espectro TOCSY do composto PTM-420-F4-F15, CDCl ₃	138
Figura vii-70 - Espectro <i>1-1-Adequate</i> do composto PTM-420-F4-F15, CDCl ₃	139
Figura vii-71 - Espectro HSQC-TOCSY editado do composto PTM-420-F4-F15, CDCl ₃	139
Figura vii-72 - Espectro H2BC do composto PTM-420-F4-F15, CDCl ₃	140
Figura vii-73 - Espectro HMBC do composto PTM-420-F4-F15, CDCl ₃	140
Figura vii-74 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F4-F15, CDCl ₃	141

Figura vii-75 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F4-F15.....	141
Figura vii-76 - Espectro IV do composto PTM-420-F4-F15, em CHCl ₃	142
Figura vii-77 – Espectro UV do composto PTM-420-F5-F31	143
Figura vii-78 – Espectro ¹ H do composto PTM-420-F5-F31, em CDCl ₃	143
Figura vii-79 - Espectro ¹³ C do composto PTM-420-F5-F31, em CDCl ₃	144
Figura vii-80 - Espectro ¹³ C DEPT 135 do composto PTM-420-F5-F31, em CDCl ₃	144
Figura vii-81 - Espectro ¹³ C DEPT 90 do composto PTM-420-F5-F31, em CDCl ₃	145
Figura vii-82 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F31	145
Figura vii-83 - Espectro IV do composto PTM-420-F5-F31, em CHCl ₃	146
Figura vii-84 – Espectro UV do composto PTM-420-F5-F38.....	147
Figura vii-85 – Espectro ¹ H do composto PTM-420-F5-F38, em CDCl ₃	147
Figura vii-86 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F38, em CDCl ₃	148
Figura vii-87 - Espectro IV do composto PTM-420-F5-F38, em CHCl ₃	148
Figura vii-88 – Perfil UV do composto PTM-420-F5-F42	149
Figura vii-89 - Espectro ¹ H do composto PTM-420-F5-F42, em CDCl ₃	149
Figura vii-90 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F42.....	150
Figura vii-91 - Espectro IV do composto PTM-420-F5-F42, em CHCl ₃	150
Figura vii-92 – Perfil UV do composto PTM-420-F5-F43.....	151
Figura vii-93 - Espectro ¹ H do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl ₃	151
Figura vii-94 - Espectro ¹³ C do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl ₃	152
Figura vii-95 - Espectro ¹³ C DEPT 90 do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl ₃	152
Figura vii-96 - Espectro ¹³ C DEPT 135 do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl ₃	153
Figura vii-97 - Espectro COSY do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl ₃	153
Figura vii-98 - Espectro TOCSY do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl ₃	154
Figura vii-99 - Espectro HSQC do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl ₃	154
Figura vii-100 - Espectro HMBC do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl ₃	155
Figura vii-101 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl ₃	155
Figura vii-102 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F43.....	156
Figura vii-103 - Espectro IV do composto PTM-420-F5-F43, em CHCl ₃	156
Figura vii-104 – Perfil UV do composto PTM-420-F5-F44.....	157
Figura vii-105 – Espectro ¹ H composto PTM-420-F5-F44, em CHCl ₃	157
Figura vii-106 – Espectro HR-ESI-MS composto PTM-420-F5-F44	158
Figura vii-107 – Espectro IV composto PTM-420-F5-F44, em CHCl ₃	158
Figura vii-108 – Perfil UV do composto PTM-420-F5-F45.....	159
Figura vii-109 – Espectro ¹ H do composto PTM-420-F5-F45, em CDCl ₃	159
Figura vii-110 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F45, em CDCl ₃	160
Figura vii-111 - Espectro IV do composto PTM-420-F5-F45, em CDCl ₃	160
Figura vii-112 - Perfil UV do composto PTM-420-F5-F47.....	161

Figura vii-113 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F47, em CDCl_3	161
Figura vii-114 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F47	162
Figura vii-115 – Perfil cromatográfico da Fração F5, 2º. crude	163
Figura vii-116 - Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F31, 2º. crude	163
Figura vii-117 - Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F43, 2º. crude	164
Figura vii-118 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F5-F43, 2º. crude	164
Figura vii-119 - Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F45, 2º. crude	165
Figura vii-120 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F5-F45, 2º. crude	165

Índice de tabelas

Tabela ii-1 – Marca e pureza dos solventes e produtos químicos utilizados.....	29
Tabela ii-2 - Eluições realizadas na cromatografia flash.....	31
Tabela iii-1 - Massa e atividades biológicas das frações obtidas do crude PTM-420	39
Tabela iii-2 - Condições de eluição para a fração F2+F3 (cromatograma no anexo vii-2)	40
Tabela iii-3 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F2+F3	41
Tabela iii-4 – Condições de eluição para a fração F4 (cromatograma no anexo vii-2)	42
Tabela iii-5 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F4	43
Tabela iii-6 - Condições de eluição para a fração F5 (cromatograma no anexo vii-2)	44
Tabela iii-7 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F5	45
Tabela iii-8 - Condições de eluição para a fração F6 (cromatograma no anexo vii-2)	46
Tabela iii-9 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F6	47
Tabela iii-10 - Condições de eluição para a fração F7 (cromatograma no anexo vii-2)	48
Tabela iii-11 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F7	49
Tabela iii-12 - Condições de eluição para a fração F8+F9 (cromatograma no anexo vii-2)	50
Tabela iii-13 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F8+F9	51
Tabela iii-14 – Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F20	60
Tabela iii-15 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F35	64
Tabela iii-16 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F35	68
Tabela iii-17 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F39A.....	72
Tabela iii-18 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F39B.....	76
Tabela iii-19 – Fragmentações de massa do composto PTM-420-F4-F15.....	80
Tabela iii-20 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F4-F15	81
Tabela vii-1 – Estruturas reportadas como sendo produzidas pela estirpe <i>S. aculeolatus</i>	97

Lista de abreviações

¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono-13

¹H: Ressonância magnética nuclear de próton

ACN: acetonitrilo

AcOEt: acetato de etilo

BHI: infusão de cérebro-coração (do inglês *Brain Heart Infusion*)

COSY: Correlation Spectroscopy

DEPT 90: *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DMAPP: pirofosfato de dimetilalilo (do inglês *Dimethylallyl pyrophosphate*)

DMSO: sulfóxido de dimetilo (do inglês *Dimethyl sulfoxide*)

DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

DO₆₀₀: densidade ótica para 600 nm

FT-IR: Infra-vermelho por transformada de Fourier (do inglês *Fourier transform infrared*)

G+C: Guanina + Citosina

H2BC: *Heteronuclear Two Bond Correlation*

HI's: isoprenóides híbridos (do inglês *hybrid isoprenoids*)

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High-performance liquid chromatography*)

HR-ESI-MS: *High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry*

HR-TOF-MS: *High-resolution time of flight mass spectrometry*

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

IPP: pirofosfato de isopentenilo (do inglês *Isopentenyl pyrophosphate*)

IV: Infra-Vermelho

LC-MS: Cromatografia líquida- Espectrometria de massa (do inglês *Liquid chromatography–mass spectrometry*)

MeOH: Metanol

MEP: via não mevalonato (do inglês *Non mevalonate pathway*)

MHz: Mega Hertz

MIC: Concentração Mínima Inibitória (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*)

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

MVA: via mevalonato (do inglês *mevalonate pathway*)

NOESY: efeito nuclear de Overhauser (do inglês *nuclear Overhauser effect*)

ppm: partes por milhão

PTM: Portugal-Madeira

qC: Carbono quaternário

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

TBT: tributilestanho

TFA: Ácido trifluor-acético (do inglês *trifluoroacetic acid*)

THN: Tetrahidroxinaftaleno

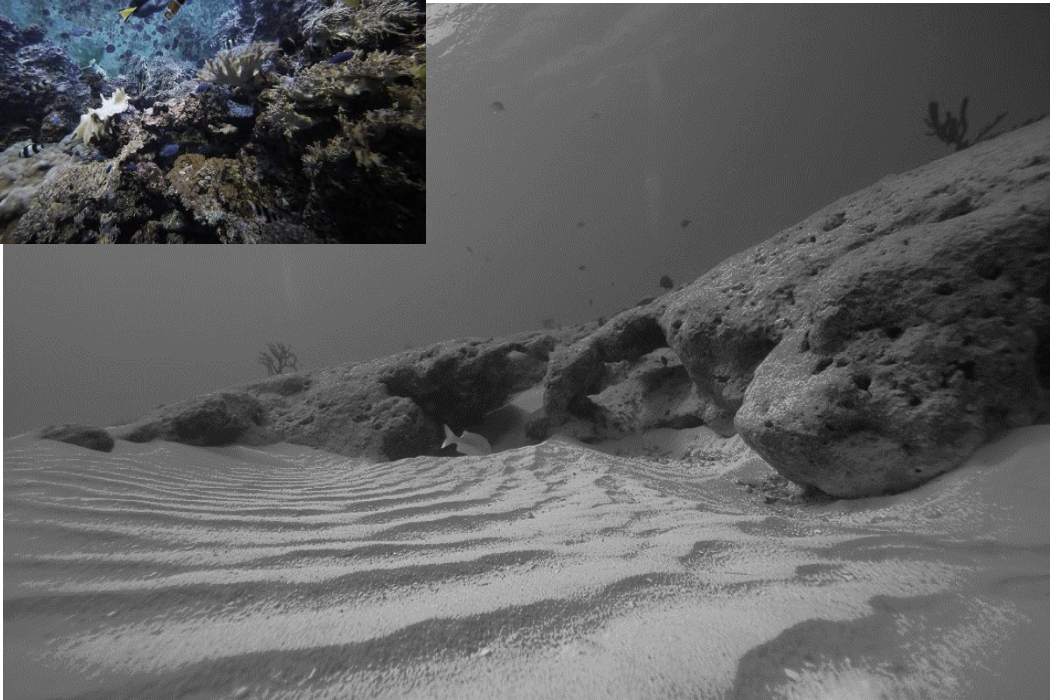
TOCSY: *Total Correlation Spectroscopy*

UV: Ultra-Violeta

VRE: *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (do inglês Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*)

λ : comprimento de onda

I. INTRODUÇÃO



https://www.google.pt/search?q=imagem+fundo+mar&espv=2&biw=1455&bih=722&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjI9L-K2cjPAhWBHBQKHeKECfUQ_AUIBigB#imgsrc=rl_QfCAsx5OYnM%3A

1. MICRORGANISMOS TERRESTRES COMO FONTE DE PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são compostos produzidos por organismos vivos, desde microrganismos procariotas até aos seres eucariotas, como fungos, plantas e animais. Estes organismos produzem metabolitos primários (vitaminas, aminoácidos, etc.) que são essenciais à sua sobrevivência e desenvolvimento, sendo que todos podem também produzir metabolitos secundários. Estes, por sua vez, são estruturalmente diversos e normalmente exibem atividade biológica de interesse, estando relacionados com a adaptação dos seres vivos ao ecossistema.^{1,2}

A década de 40 marcou o início de uma nova Era, *the golden age of antibiotics*, onde se começou a apostar numa intensa investigação da Natureza como fonte de metabolitos secundários bioativos, tendo os microrganismos revelado ser uma fonte prolífica de compostos ativos e estruturalmente diversos.^{1,2,3}

Contudo, entre os anos 70 e 90 a eficiência da investigação em microrganismos terrestres diminuiu, os custos aumentaram e os novos metabolitos que surgiram eram essencialmente análogos a estruturas já elucidadas.^{1,4,5} Com o desenvolvimento tecnológico abriram-se fundamentalmente duas áreas distintas que revolucionaram a investigação dos produtos naturais: por um lado o processo de descoberta de novos fármacos precisava de ser modernizado o que veio acontecer com o desenvolvimento das tecnologias ómicas (ex. genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica), por outro lado permitiram a exploração de novos ambientes naturais mais diversos, como por exemplo, os fundos oceânicos.

2. EXPLORAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS

A biodiversidade microbiana do fundo dos oceanos é muito superior à terrestre, sabendo-se que há uma abundância microbiana de 10^6 /mL na água do mar e 10^9 /mL nos sedimentos oceânicos. Mas a exploração dos ecossistemas marinhos só começou a ser largamente considerada com o aparecimento das técnicas de mergulho uma vez que 60% do ambiente marinho apresenta 2000 m de profundidade.^{3,6}

Desde 2008 que mais de mil compostos marinhos foram descobertos anualmente, figura i-1. Devido à peculiaridade destes ambientes, que estão sujeitos a diferentes condições de pressão e temperatura, luminosidade e variação dos níveis de salinidade e oxigénio, os compostos apresentam estruturas químicas únicas e de elevada atividade biológica com interesse relevante no desenvolvimento de novos medicamentos.⁷

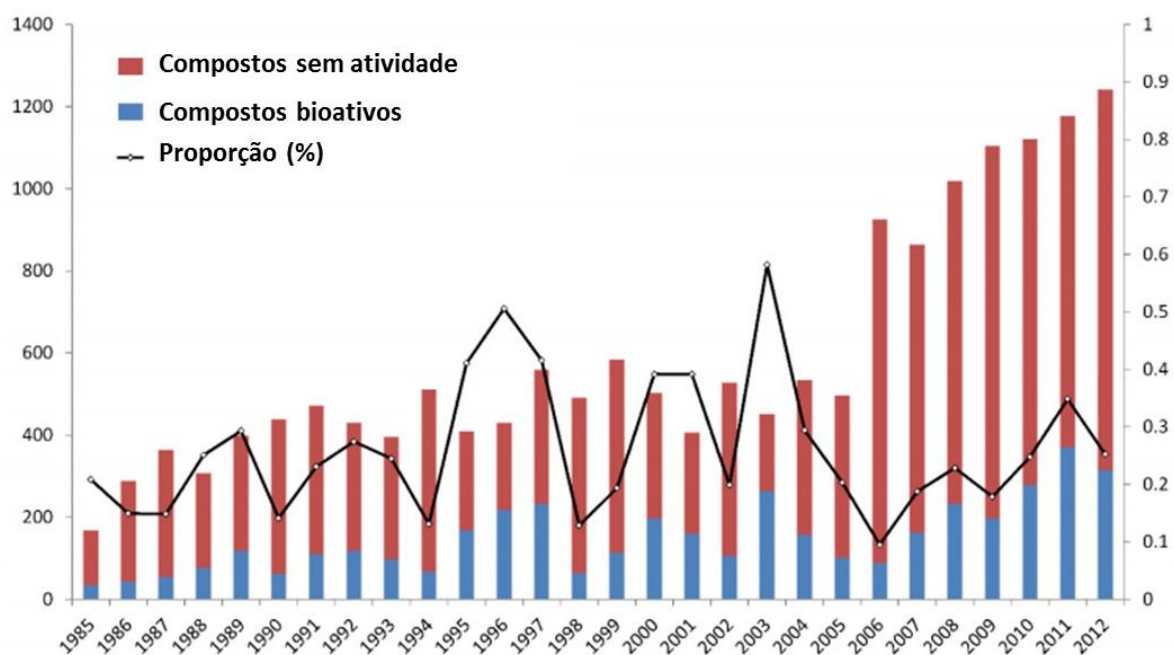


Figura i-1 - Variação do número de compostos marinhos descobertos entre 1985 e 2012⁷

Na figura i-1 observa-se que na última década a proporção de novos compostos bioativos tem vindo a baixar, apesar do constante aumento de novos metabolitos descobertos. Isto sugere que a investigação centrada na avaliação da atividade biológica não está a acompanhar a descoberta de novos compostos, sendo necessário melhorar o processo de descoberta da bioatividade, pois acredita-se que estes compostos possuem atividade específica e seletiva, baseada nos mecanismos de ação.⁷

2.1. METABOLITOS PRODUZIDOS POR ORGANISMOS MARINHOS

Os metabolitos secundários podem ser agrupados em oito categorias representativas, figura i-2, onde se verifica que os terpenos são a classe de compostos mais estudados, apesar da proporção de compostos ativos / inativos ser baixa. Contudo, este facto não significa que terpenos não possuam atividade biológica, significa apenas que esta pode não ter sido ainda estudada.⁷

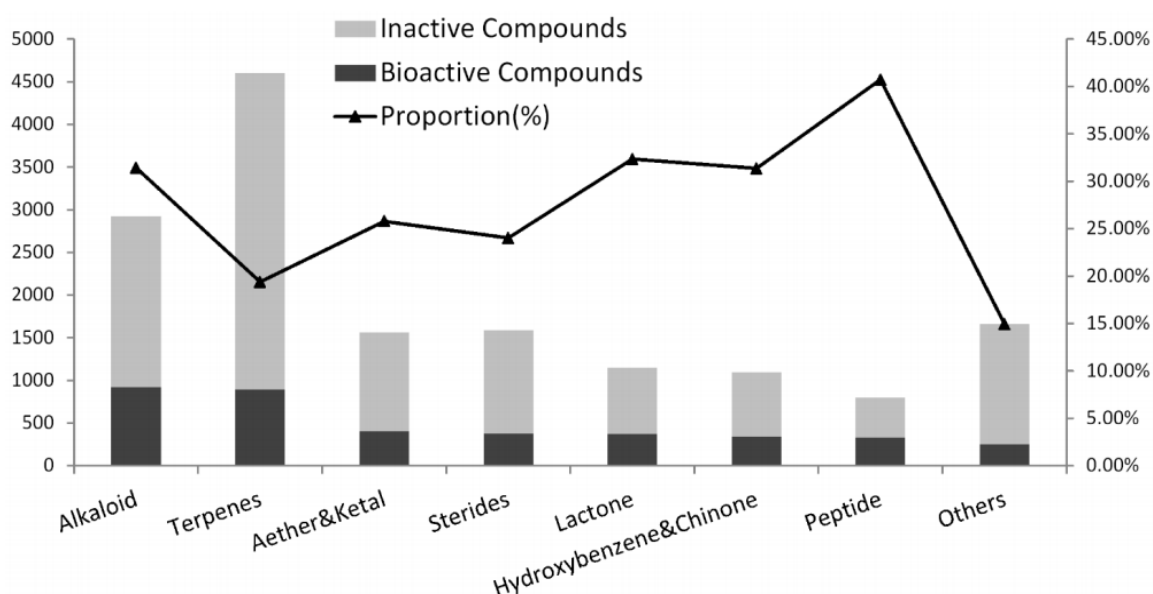


Figura i-2 – Quantidade e proporção de estruturas bioativas produzidas nas classes de compostos⁷

Na figura i-3 encontra-se representada a correlação entre o tipo de bioatividade e as principais classes de produtos naturais. Verifica-se que as percentagens das atividades biológicas são semelhantes para as diferentes classes de compostos. Todas as classes apresentam maioritariamente atividade anticancerígena, seguindo-se as atividades antibacteriana e antifúngica.⁷ Muito provavelmente porque os esforços de investigação têm vindo a incidir mais sobre estes três tipos de atividades biológicas.⁷

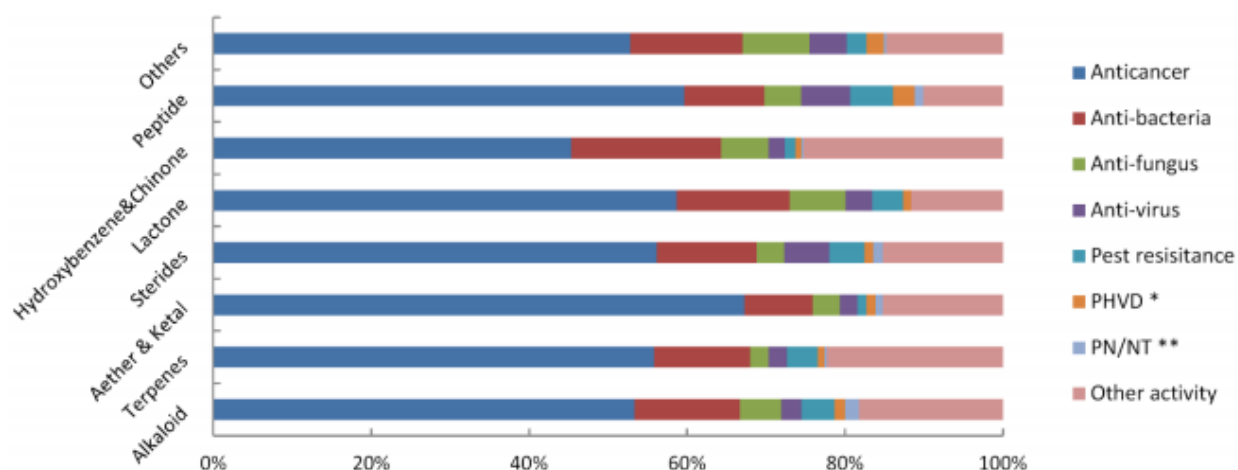


Figura i-3 – Análise da bioatividade dos compostos de acordo com a estrutura química. (PHVD: *Prevention of heart and vascular disease, ** PN/NT: Protection of neurons/neurotoxicity)⁷

Os organismos marinhos estão essencialmente divididos em três grandes grupos: algas, microrganismos e invertebrados. A figura i-4 ilustra algumas das espécies constituintes desses grupos, relacionando a quantidade de metabolitos produzidos pelas mesmas. Verifica-se que a classe de actinomicetas (ou actinobactérias) apresenta uma das maiores razões de compostos ativos / inativos no grupo dos microrganismos marinhos, dando um contributo essencial no aumento de metabolitos bioativos produzidos por organismos marinhos.⁷

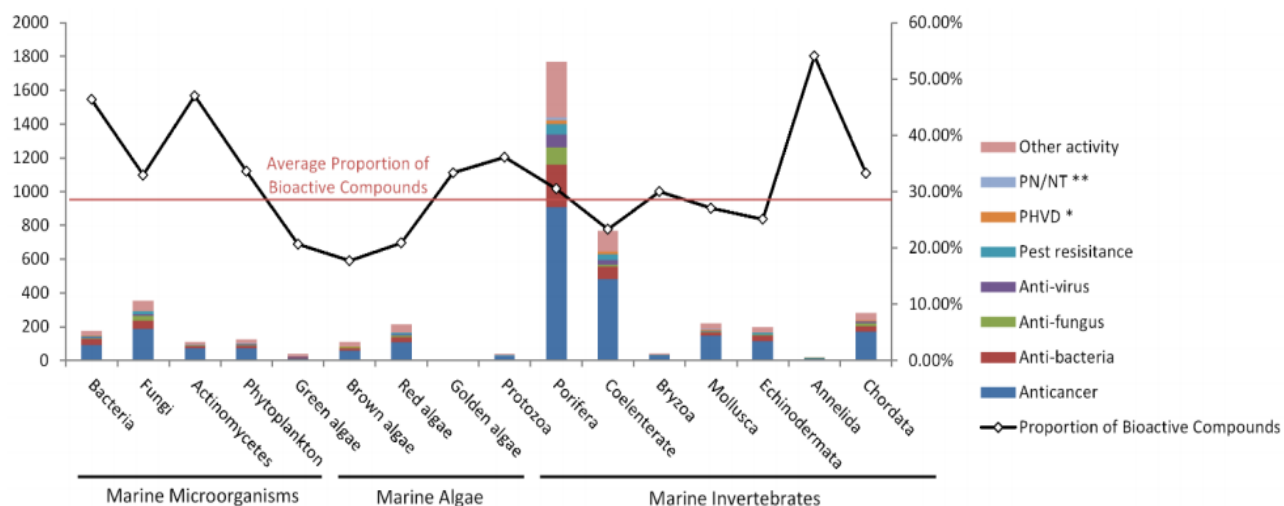


Figura i-4 – Quantidade e proporção de compostos ativos/ inativos produzidos por espécies das três classes de organismos marinhos⁷

Embora os fundos oceânicos constituam uma área vasta, a pesquisa da diversidade microbiana é ainda escassa (apenas 1% das actinobactérias é cultivável com os procedimentos reportados).¹ Apesar disto, os ambientes marinhos revelam-se uma fonte promissora de microrganismos produtores de metabolitos bioativos com interesse farmacêutico, com especial relevância para as actinobactérias.^{7,6}

3. ACTINOBACTÉRIAS MARINHAS

As actinobactérias são bactérias Gram positivas. Muitas apresentam esporos aéreos e são caracterizadas por ter um alto teor de G+C no seu DNA. São os procariontes mais valiosos a nível económico e biotecnológico, estando distribuídas por vários habitats marinhos desde os sedimentos oceânicos mais profundos até aos recifes de coral.^{8,9,10,11}

Dado que os ecossistemas terrestres e marinhos são diferentes é plausível presumir que as actinobactérias tenham características distintas, tais como a produção de diferentes tipos de compostos como consequência da adaptação a condições extremas durante o processo evolutivo, diferenças de pressão e temperatura e condições anaeróbias. Embora se tenha verificado que algumas actinobactérias terrestres podem ser facilmente recolhidas de sedimentos marinhos provenientes da zona interdital, estudos recentes comprovam a existência de espécies nativas dos oceanos, como os géneros *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora* e *Marinispora*. O isolamento e cultura de algumas destas estirpes marinhas requerem a presença obrigatória de iões Na⁺ no seu meio de cultura.^{6,8}

Visto que as actinobactérias terrestres do género *Streptomyces* se revelaram importantes produtores de metabolitos secundários bioativos, surgiu também um interesse químico e biológico em explorar as suas homólogas marinhas.⁸

3.1. GÉNERO *Streptomyces* – MAR4

O género *Streptomyces* é extraordinariamente diverso, tendo sido descritas cerca de 600 espécies¹⁰. Estas bactérias são filamentosas, Gram positivas e saprófitas. São conhecidas como habitantes do solo onde desempenham um importante papel ecológico na degradação de matéria orgânica e na supressão de plantas patogénicas. Estão também distribuídas por sedimentos marinhos, formando relações de simbiose com plantas e esponjas marinhas. Têm sido largamente exploradas devido à sua capacidade de produzir metabolitos secundários estruturalmente diversos e com interesse farmacológico.^{9,10}

As espécies marinhas recolhidas de sedimentos costeiros podem ser cultivadas em laboratório e muitas destas estirpes são idênticas ou estão intimamente relacionadas com estirpes terrestres já relatadas, sugerindo um alto grau de adaptação ambiental. No entanto estão a ser identificados novos filotipos, exclusivamente marinhos, em adição às espécies que ocorrem tanto em terra como no mar.³

A figura i-5 revela a diversidade de actinobactérias, sendo as mesmas agrupadas em 13 grupos de acordo com a sua filogenia.³

A linhagem MAR4 agrupa as diversas estirpes *Streptomyces* em função da sua semelhança relativamente ao gene 16S, sendo atualmente conhecidas 57 estirpes cultivadas e 180 clonadas. Estas estirpes exibem uma divergência de 4.1% no gene 16S dentro do género *Streptomyces* e encontram-se distribuídas entre os ambientes marinho e terrestre, considerando-se que 46 das 57 estirpes são de origem marinha.^{10,12}

A linhagem MAR4 inclui as espécies *S. synnematoformans* e *S. aculeolatus* (estudada neste trabalho). Estas espécies originam uma bifurcação dentro do grupo MAR4, separando as estirpes pelas características de produção de metabolitos secundários.¹⁰

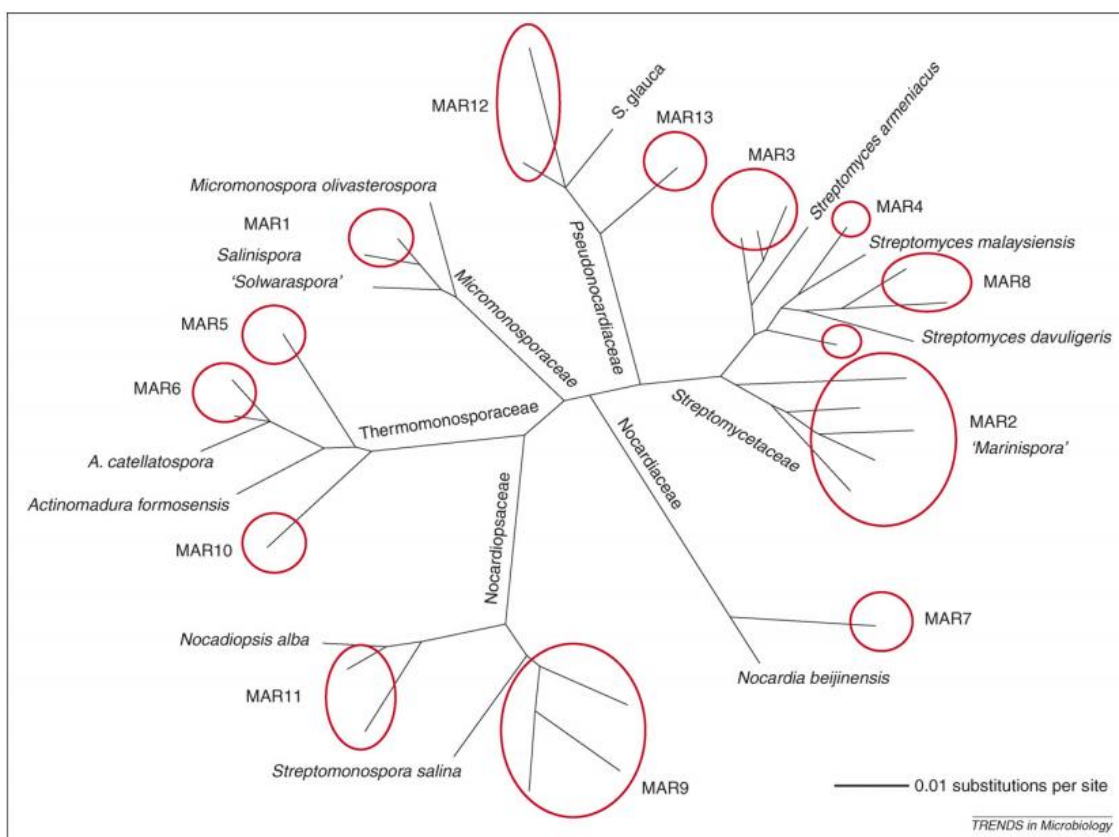


Figura i-5 – Relações filogenéticas entre as várias linhagens, designadas “MAR”³

4. ISOPRENÓIDES HÍBRIDOS

Os isoprenóides híbridos (HI's) são caracterizados por ter uma parte terpenóide, de diferentes níveis de complexidade, associada a moléculas como péptidos ribossomais e não ribossomais, fenazinas ou pirroles. Os terpenóides são constituídos por subunidades de isoprenos de 5 carbonos, originando uma grande variedade de estruturas que geralmente variam entre monoterpénos (2 unidades de isopreno) e triterpénos (6 unidades de isopreno). A ligação de um isoprenóide a outra molécula ocorre através das enzimas preniltransferases (PTases), podendo ter como ponto de ligação um átomo de carbono, oxigénio, azoto ou outra unidade de isopreno, formando-se assim os HI's. Pensa-se que a união das duas subestruturas potencia a atividade biológica da molécula gerada devido à afinidade da porção de isopreno por membranas biológicas.¹¹

Esta classe de moléculas é conhecida por desempenhar diversos papéis ecológicos, como sinalização e defesa química, sendo também responsáveis por muitos dos odores

associados a frutas e a plantas. Por razões ainda desconhecidas os terpenóides e os isoprenóides híbridos não costumam estar associados ao reino procarionte, exceto à classe das actinobactérias. Estes metabolitos secundários são maioritariamente encontrados em plantas, insetos e fungos.¹¹

4.1. BIOSSÍNTESE DE ISOPRENÓIDES HÍBRIDOS

Apesar dos HI's produzidos por actinobactérias serem raros, os compostos que têm sido descobertos são de grande interesse a nível estrutural, figura i-6. Este interesse coincide com o aumento da descoberta de novos HI's e da observação de que estirpes marinhas e não marinhas podem produzir os mesmos metabolitos secundários.¹⁰

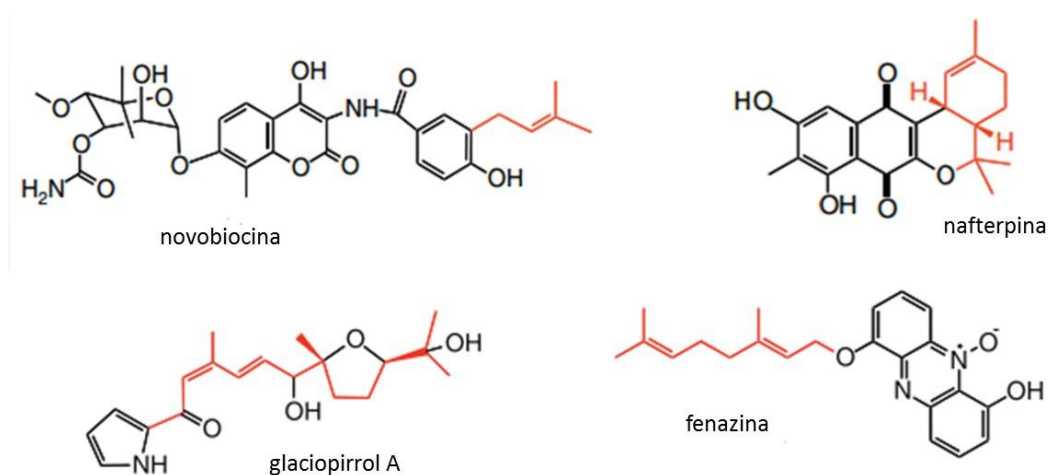


Figura i-6 – Estruturas de isoprenóides híbridos produzidos por actinobactérias¹¹, fragmento terpénico destacado a vermelho.

A linhagem MAR4 tem sido associada à produção de HI's.^{10,11,12} Estas actinobactérias usam duas vias distintas para a produção de pirofosfato de isopentenilo (IPP) e pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), (figura i-7), que são os precursores das unidades de cinco carbonos do isopreno incorporados nos terpenóides: a via não mevalonato (MEP), que é frequentemente encontrada em bactérias e pensa-se ser a via principal de incorporação de isoprenos nos metabolitos primários; e a via mevalonato (MVA) que está amplamente distribuída nos eucariotas, sendo encontrada esporadicamente em bactérias. Estas duas vias têm sido relacionadas com a produção de HI's. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a via MVA não é o fator determinante para as actinobactérias produzirem estes metabolitos. O objetivo de entender a diversidade de agrupamentos genéticos envolvidos na produção de HI's passa por ligar estas moléculas às suas funções ecológicas no ambiente.^{11,12,13,14}

Todas as unidades de isopreno são construídas através de reações de condensação entre o DMAPP e o IPP, figura i-7, sendo que o comprimento da cadeia é determinado pelas PTases correspondentes. Quando os aceitadores das reações catalisadas pelas PTases são de outras famílias, como os flavonoides, figura i-8, ocorre a formação de HI's, como as napiradiomicinas e as marinonas.¹⁵

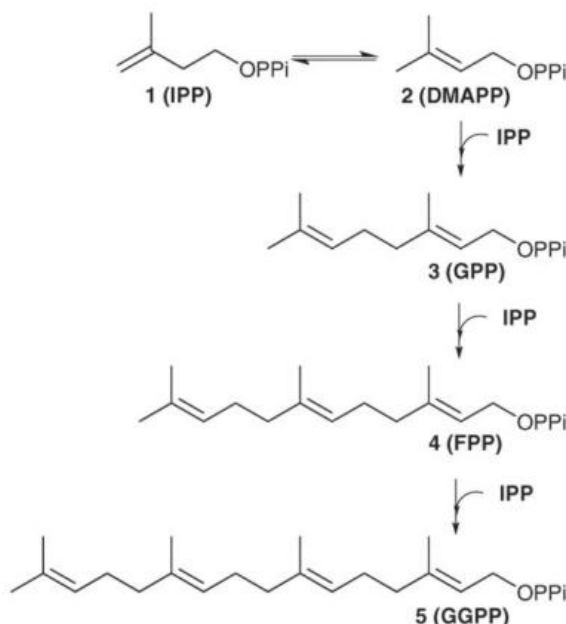


Figura i-7 - Formação das cadeias de terpenóides a partir do IPP e do DMAPP¹⁵

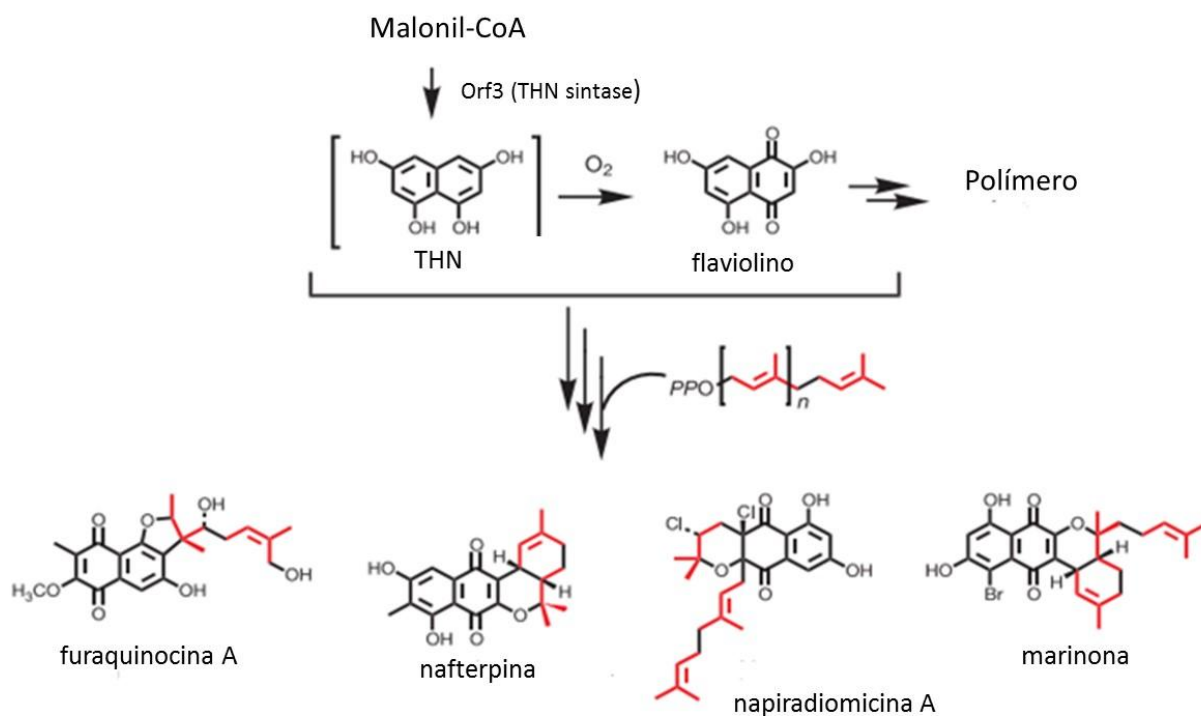


Figura i-8 – Exemplos de isoprenóides híbridos e a sua biossíntese,⁴⁹ fragmento terpénico destacado a vermelho

4.2. ISOPRENÓIDES HÍBRIDOS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM MAR4

Até à data, as estirpes pertencentes à linhagem MAR4 produzem essencialmente nampiradiomicinas, marinonas, nitropirrolinas, fenazinas preniladas, como lavanducianina e marinofenazina B, e azamerona, um composto pertencente à classe ftalazinona, figura i-9.^{10,12,16}

A produção destas classes de compostos varia de acordo com a estirpe, por exemplo as linhagens de *S. aculeolatus* produzem mais compostos pertencentes à família das nampiradiomicinas, enquanto as *S. synnematoformans* produzem essencialmente marinonas.¹⁰ No anexo vii-1 encontra-se uma tabela que reúne todos os compostos produzidos pela estirpe *Streptomyces aculeolatus* reportados na literatura até Fevereiro de 2016.

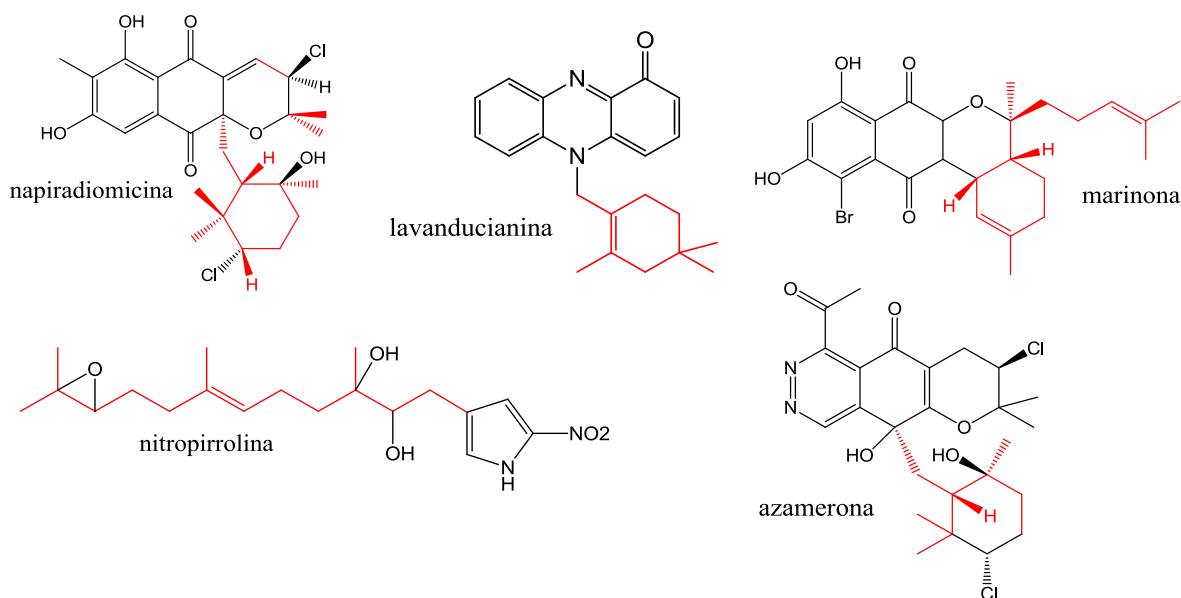


Figura i-9 - Classes de isoprenóides híbridos produzidos na linhagem MAR4,¹⁰ Fragmento terpénico destacado a vermelho

4.2.1. NAPIRADIOMICINAS

A família napiradiomicina é uma classe de metabolitos produzidos essencialmente por bactérias pertencentes à estirpe de *Streptomyces aculeolatus*¹⁰. A primeira napiradiomicina foi descoberta em 1986, tendo sido isolada de microrganismos terrestres. Até hoje, foram descobertas mais de 43 estruturas provenientes de sedimentos terrestres e marinhos.¹⁶

Exibem uma vasta gama de atividades biológicas, nomeadamente atividade antibacteriana, inibição de ATPases gástricas, citotoxicidade e indução de apoptoses celulares.¹⁶

São constituídas por uma porção 2,3-dihidro-naftoquinona, uma unidade de prenil ligada em C-11 e uma unidade terpenóide na posição C-1. As variações nas napiradiomicinas surgem normalmente a partir do carbono-14 onde a sub-unidade de terpeno pode ser linear, ciclizar-se num anel de 6 ou 14 membros, figura i-10. As variações relacionadas com a halogenação também contribuem para a diversidade de estruturas desta família.¹⁶ Estas estruturas apresentam um perfil de UV característico, figura i-11.

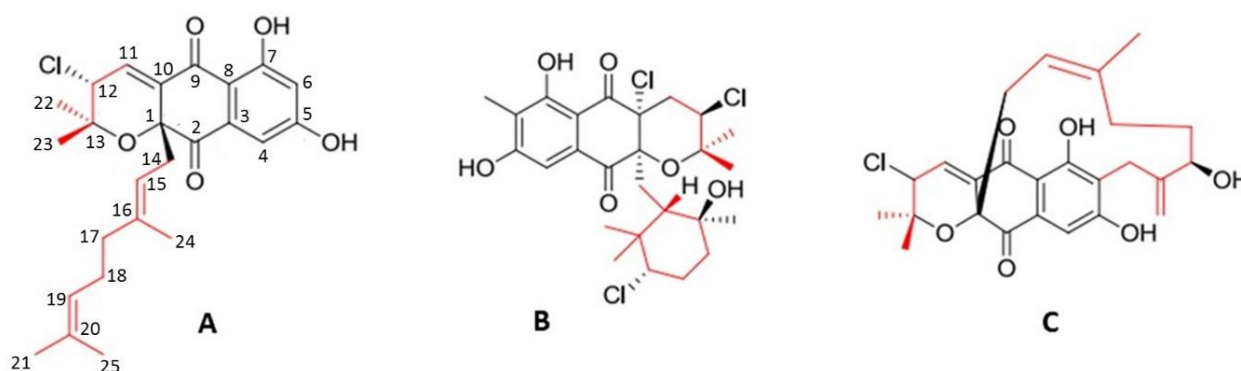


Figura i-10 - Estruturas da família das napiradiomicinas¹⁶, fragmento terpenico destacado a vermelho

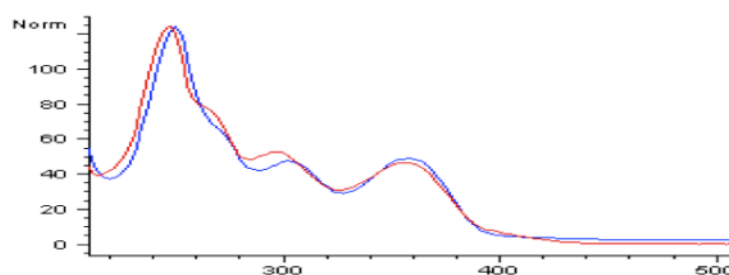


Figura i-11 – Perfil UV da família napiradiomicina¹⁰

Os compostos da família napiradiomicina são biossintetizados através do pentacetídeo THN (tetrahidroxinaftaleno) enquanto as suas unidades isoprenóides provêm da via mevalonato (MVA). Foi proposta uma biossíntese com base na lógica *nap cluster*, figura i-12. O núcleo de hidroquinona é catalisado por uma enzima designada *type III polyketide synthase*, homóloga à enzima *THN synthase NapB1*, que condensa cinco moléculas de malonil-CoA para originar uma molécula de THN. A mono-oxigenase NapB2 oxida o THN para o flaviolino que é posteriormente metilado pela NapB5 metiltransferase. A primeira ligação da unidade de isopreno proveniente do DMAPP ocorre através de um ataque nucleofílico, envolvendo uma das PTases (NapT8/NapT9). A hidrogenação ou cloração em C-2 pode facilitar a segunda prenilação, desta vez em C-3, com o pirofosfato de geranilo para originar o intermediário SF2415B1. A ciclização da sub-unidade hemiterpeno através de um ião de cloro é catalisada por NapH1, H3 ou H4 dando origem ao derivado 7-metil napiradiomicina A1. A sub-unidade do monoterpeno 7-metil napiradiomicina sofre ciclização para originar as estruturas 1 e 3, em que uma molécula de água é incorporada no radical ciclo-hexanol. Além disso, provavelmente a descloração da estrutura 1 origina a 2, figura i-12.¹⁷

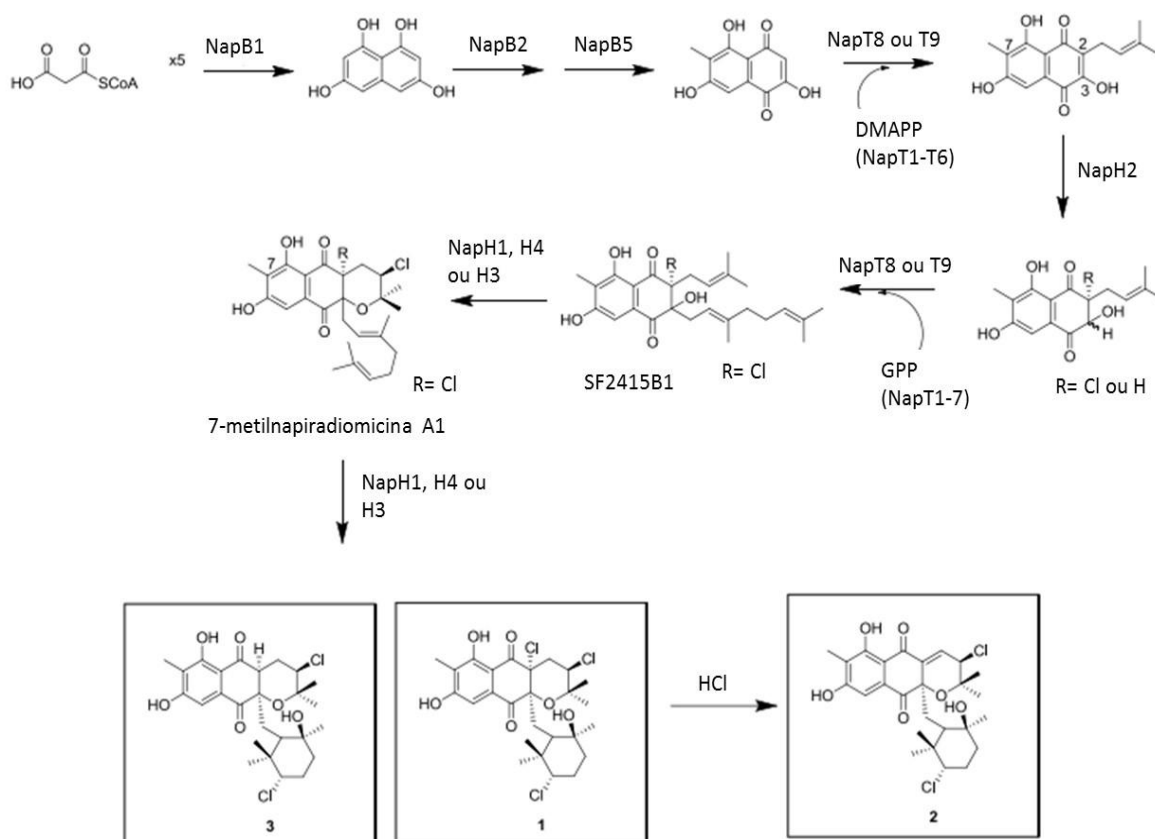


Figura i-12 – Via biossintética proposta para as napiradiomicinas¹⁷

4.2.2. MARINONAS

A família marinona contém duas séries de estruturas: as marinonas e os seus análogos que contém um resíduo de sesquiterpeno não rearranjado e que é ligado através do C-1 do farnesil pirofosfato ao núcleo da naftoquinona. Por outro lado existem as neomarinonas que têm uma fração de sesquiterpeno altamente rearranjada, figura i-13.¹⁸

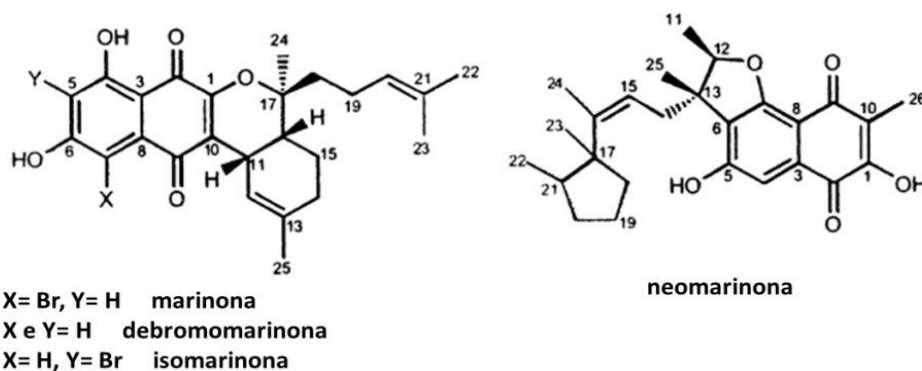


Figura i-13 – Séries A e B de marinonas¹⁸

Com base na marcação isotópica e espectroscopia de RMN 2D foi proposto o seguinte processo de biossíntese para a família das marinonas, figura i-14. Estes estudos revelaram que a porção naftoquinona é derivada de um intermediário policetídeo, como o tetrahidroxinaftaleno (THN), enquanto a unidade sesquiterpeno é proveniente da via não mevalonato.¹⁸

Os compostos marinonas são conhecidas pela sua atividade antibiótica contra bactérias Gram positivas e distinguem-se pelo seu perfil de UV característico, figura i-15.

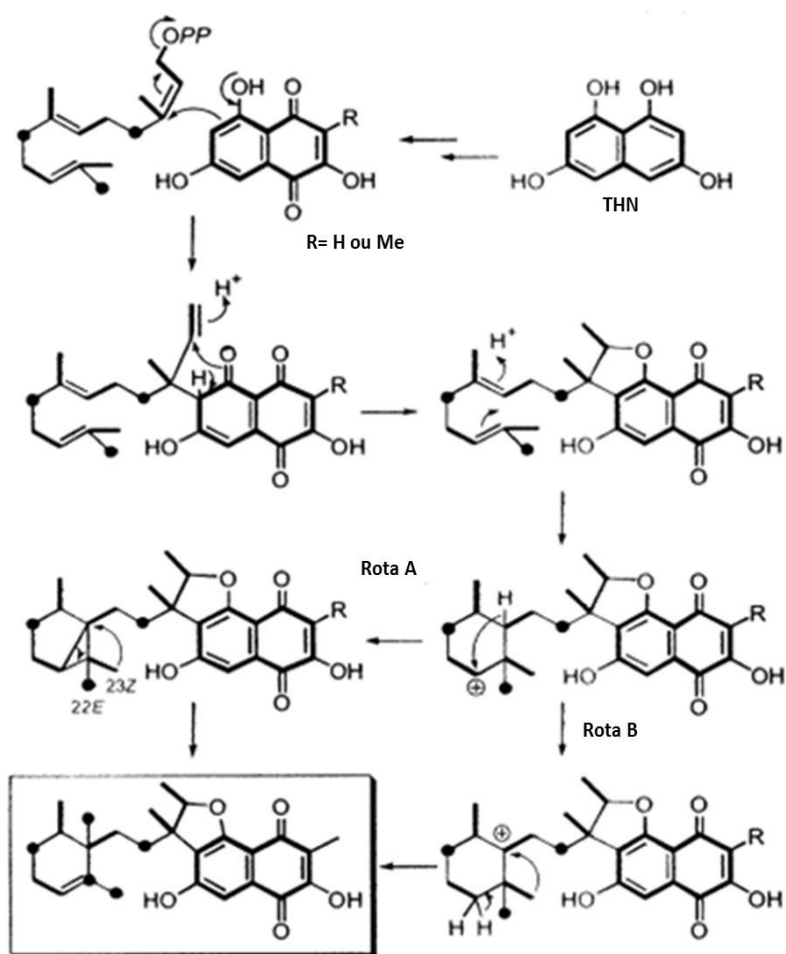


Figura i-14 – Proposta biossintética de um tipo de marinona¹⁸

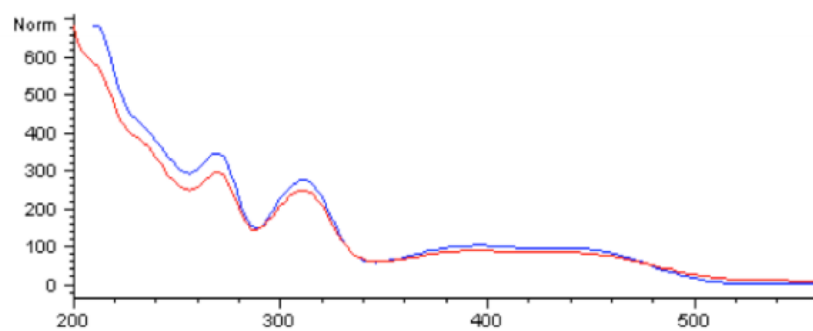


Figura i-15 – Perfil UV da família marinona¹⁰

4.2.3. NITROPIRROLINAS

Os compostos da família nitropirrolina fazem parte de um grupo denominado α -nitropirróis (nitropirrol-terpenos). Esta família subdivide-se em duas séries: heronapirrol e nitropirrolina (figura i-16), descobertos quase simultaneamente por diferentes investigadores. Os compostos heronapirrol foram relatados recentemente como sendo produzidos por espécies *Streptomyces* e dispõem de atividade contra a *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, enquanto os compostos nitropirrolina apresentam atividade contra as linhas celulares do carcinoma do cólon humano.¹⁹

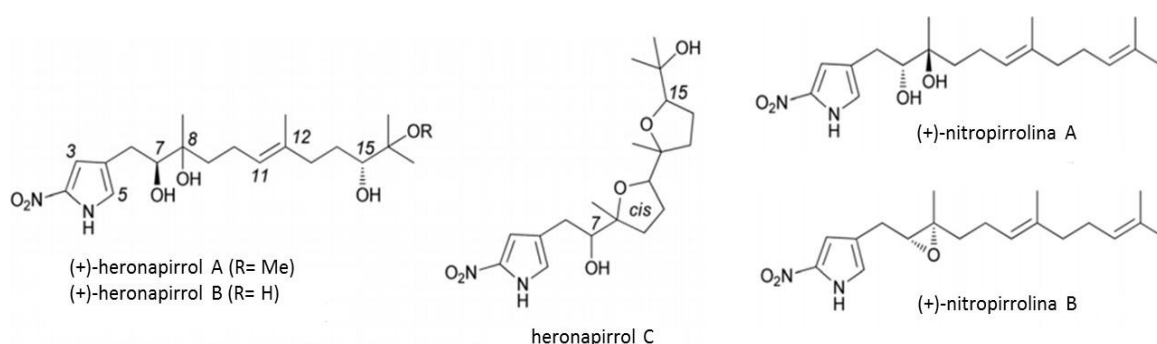


Figura i-16 – Compostos heronapirroles e nitropirrolinas¹⁹

Todos estes nitropirrol-terpenos apresentam o mesmo anel heterocíclico com grandes semelhanças em relação à funcionalização oxidativa da cadeia lateral de farnesil, sendo possível presumir que existe uma relação nas suas biossínteses.¹⁹

É proposto que o anel de pirrol derive do α -aminoácido, L-prolina. Este por sua vez sofre uma nitração e é ligado à unidade terpenóide de farnesil, seguindo-se epoxidações e reações de ciclização, obtendo-se os compostos A-D, figura i-17.¹⁹

O perfil UV da família nitropirrolina é também característico, figura i-18.¹⁹

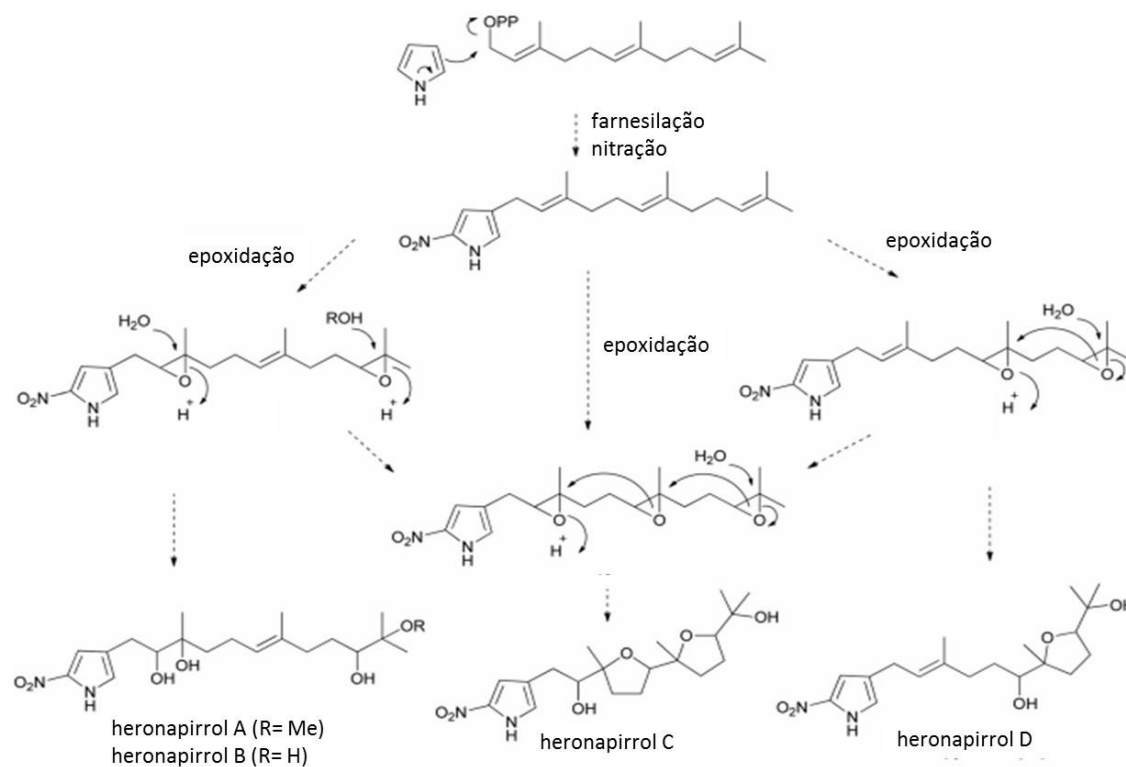


Figura i-17 – Proposta biossintética para nitropirrolenos¹⁹

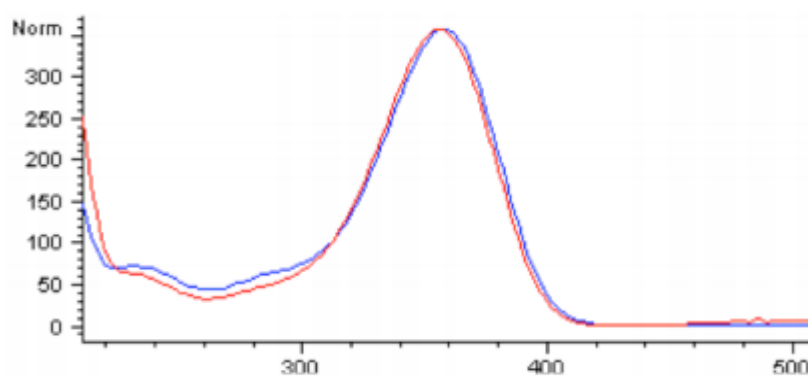


Figura i-18 – Perfil UV característico da família nitropirrolina¹⁰

4.2.4. FENAZINAS

A classe de compostos fenazinas caracteriza-se por apresentar um anel heterocíclico que contém azoto, estes compostos são de elevado interesse devido à sua diversidade estrutural, como a família marinofenazina e a lavanducianina, produzidas na linhagem MAR4, figura i-19.^{12,20}

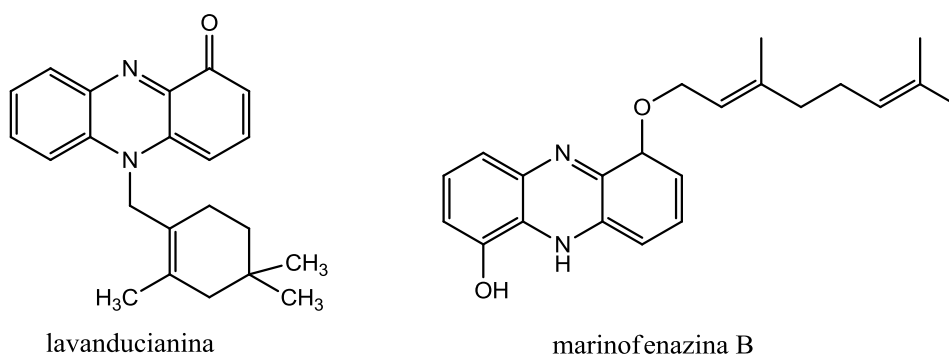


Figura i-19 – Estruturas de lavanducianina e marinofenazina B^{12, 20}

Estes compostos revelaram atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral, podendo também ter atividade de proteção de células neuronais.

A via biossintética de fenazinas ainda não se encontra completamente descrita, mas sabe-se que intervêm enzimas semelhantes à via do ácido xiquímico, sendo estas imprescindíveis para a sua biossíntese, figura i-20.^{20,21}

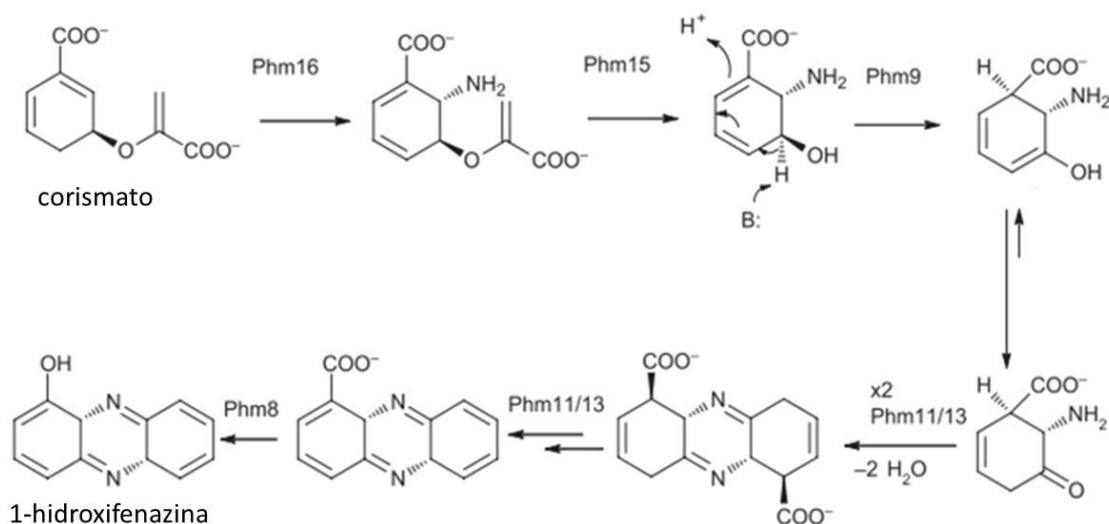


Figura i-20 – Proposta para a formação do anel 1-hidroxfenazina²¹

Posteriormente à formação do anel 1-hidroxifenazina, ocorre a ligação da porção de isopreno que é catalizada por uma peniltransferase aromática. Esta é codificada pelo gene Phm7, sendo responsável pela ligação de uma unidade isopreno a aceptores aromáticos ricos em elétrons.²¹

Relativamente à formação de fenazinas O-preniladas, como a marinofenazina, sabe-se que estão envolvidas outras enzimas que catalizam a formação da ligação C-O depois de ocorrer dois passos de descarboxilação hidroxilativa.²²

4.2.5. AZAMERONA

Em 2002 verificou-se que a estirpe CNQ766 pertencente ao grupo MAR4 produzia uma ftalazinona meroterpenóide incomum, designada azamerona, figura i-21. O anel de ftalazinona, até à data nunca tinha sido observado na Natureza, apresentando atividade citotóxica contra esplenócitos de células-T de ratos e macrófagos.²³

O composto azamerona levanta questões relacionadas com a sua biossíntese, em particular a incorporação da ligação N-N na estrutura. Devido à sua semelhança com outros terpenóides produzidos no grupo MAR4, como estruturas que contém um anel de diazonaftoquinona, pensa-se que a sua biossíntese esteja relacionada com o rearranjo destas estruturas.²³

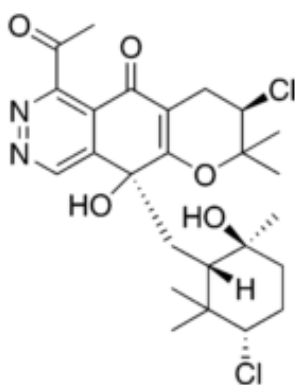


Figura i-21 - Azamerona²³

5. MACRÓLIDOS PRODUZIDOS PELO GÉNERO *STREPTOMYCES*

O genoma do género *Streptomyces* é invulgarmente extenso para uma bactéria, o que origina uma grande variedade de metabolitos produzidos nos processos de fermentação microbiana.²⁴

Como referido anteriormente, dentro da família *Streptomycetaceae* existe o agrupamento filogenético denominado MAR4, reunindo várias linhagens do género *Streptomyces* que produzem isoprenóides híbridos. Algumas espécies não incluídas no grupo MAR4 produzem compostos pertencentes ao grupo dos macrólidos policetídeos (lactonas cíclicas) em que o número de átomos no anel pode variar entre 14 e 18 membros. Estes compostos podem ter atividade antibiótica, antitumoral, antifúngica, anti-parasitária, etc.^{4,24}

O primeiro macrólido produzido por estirpes *Streptomyces* foi descoberto em 1951, sendo denominado de picromicina²⁵ (figura i-22). Este foi isolado da espécie *S. venezuelae* e tem atividade antibiótica. Outros compostos produzidos pelo género *Streptomyces* são, por exemplo, as nistatinas²⁶ (figura i-22), produzidas pela *S. noursei*, e anfotericina B, produzida por *S. nosodus*, ambos fármacos antifúngicos comercializados. Outra família de compostos produzidos por *S. avermitilis*, a avermectina (figura i-22), apresenta propriedades antiparasíticas.²⁴

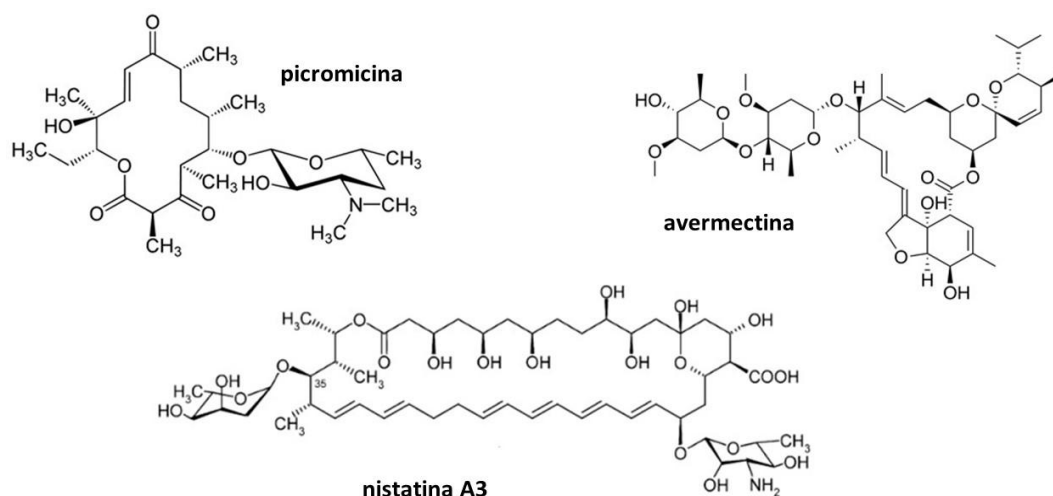


Figura i-22 – Exemplos de macrólidos produzidos pelo género *Streptomyces*^{24,26,28}

Muitos destes macrólidos policetídeos são formados por intermediários metabólicos simples, como o acetato, propionato e butirato, sendo sintetizados por enzimas denominadas *poliketide synthases*. O genoma do género *Streptomyces* codifica numerosas enzimas P450 que estão diretamente envolvidas na biossíntese dos macrólidos, ainda que os mecanismos permaneçam pouco explorados.^{26,27,28}

6. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Muitos dos metabolitos secundários produzidos por microrganismos exibem atividade biológica antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiviral, antiprotozoal, hipocolisterêmica, entre outras. Estes compostos são usualmente utilizados na prática médica e veterinária, na agricultura e na indústria.²⁴

Cerca de 14 mil compostos de origem microbiana possuem atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária). Destes, cerca de 66% exibem atividade contra bactérias Gram positivas e 30% contra bactérias Gram negativas, 34% exibe atividade antifúngica.²⁴

Entre os produtos de origem bacteriana, os metabolitos secundários produzidos pelo género *Streptomyces* destaca-se como a fonte mais rica de antibióticos e compostos industrialmente importantes.⁹

Neste trabalho as propriedades de 104 metabolitos isolados foram testadas em ensaios antibacterianos contra as bactérias multiresistentes MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* COL²⁹), VRE (Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* EF82³⁰). No âmbito de outras teses a decorrer em paralelo foram também avaliadas as propriedades antibiofilme contra *Staphylococcus aureus*, anticancerígena contra linhas celulares do carcinoma do cólon humano (HCT-116), e anti-incrustante contra a bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e larvas de mexilhão da espécie *mytilus galloprovincialis*.²⁴

6.1. *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA)

Desde o início dos anos 80 que a resistência aos medicamentos por parte das bactérias Gram positivas tem vindo a aumentar, resultando numa taxa de mortalidade significativa e elevados custos.

Em 1944 foi descoberta a primeira resistência de estirpes *Staphylococcus* contra a penicilina, em 1951 contra a estreptomicina em 1958 contra a novobiocina e em 1962 contra a meticilina. A resistência das estirpes de *S. aureus* pode acontecer de duas formas: pela produção de β -lactamases, enzimas que quebram o anel β -lactâmico dos antibióticos que o possuem; ou através da aquisição de um gene que codifica a proteína PBP2a (*penicillin binding protein 2A*). Esta proteína faz com que os compostos resistentes às penicilidasas tenham baixa afinidade pelo local de ligação na bactéria, a parede celular, e por consequência, deixem de ser eficazes.³¹

Os casos de internamento por MRSA e a taxa de mortalidade têm aumentado mundialmente de ano para ano, estimando-se que a taxa de mortalidade a nível mundial seja de 20% (variando consideravelmente com os estudos e contextos).³²

Esta infeção pode ser transmitida através de contacto físico ou transmitida indiretamente através de toalhas, brinquedos, etc. Estas bactérias podem causar infeções mais graves se entrarem em fissuras na pele, como feridas cirúrgicas, daí serem mais comuns em ambientes hospitalares.³³

6.2. *Enterococcus* RESISTENTE À VANCOMICINA (VRE)

As bactérias *Enterococcus* habitam o aparelho digestivo e urinário, sendo responsáveis pelo aumento de infeções hospitalares e endocardite.³⁴

Uma das principais razões para estes patógenos sobreviverem em ambiente hospitalar é a sua resistência a todos os antibióticos vulgarmente utilizados, como as cefalosporinas. O fator mais importante que permite a resistência aos antibióticos por parte destas estirpes é a sua capacidade de mutação ou receção de material genético de plasmídeos. Desta forma as *Enterococcus* podem apresentar dois tipos de resistência: β -lactâmica, que ocorre devido à produção de proteínas PBP, como acontece nas estirpes de MRSA; e resistência aminoglicosídica, que ocorre devido à produção de enzimas que promovem a inativação de antibióticos aminoglicosídicos.³⁴

A vancomicina, que afeta a síntese de peptidoglicano nas paredes celulares das bactérias, esteve em uso clínico durante 30 anos sem o surgimento de estirpes resistentes à mesma, sendo os primeiros casos de resistência relatados em 1988.³⁵ Depois deste período e devido às características do género *Enterococcus*, é urgente a descoberta de novos medicamentos com propriedades contra VRE.³⁴

6.3. ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA

Os compostos foram testados contra as linhas celulares HCT-116 do carcinoma do cólon humano, que é a terceira maior causa de morte por cancro no mundo, registando perto de 700 mil mortes em 2012 a nível mundial.³⁶ Além disso tem surgido uma grande resistência das células cancerígenas a um dos principais tratamentos utilizados, a quimioterapia. Por outro lado, um grave problema da quimioterapia convencional é a sua elevada toxicidades para as

células não-cancerígenas. Desta forma existe uma grande necessidade de descoberta de novos agentes anticancerígenos que possam ultrapassar o insucesso da quimioterapia.

Os compostos com atividade anticancerígena produzidos por actinobactérias descobertos até agora pertencem às famílias de compostos antraciclina, indolocarbazole, macrólido, péptido não ribossomais e isoprenoíde, podendo ter diversos mecanismos de ação perante as linhas celulares dos carcinomas para os quais foram testados: através da indução da apoptose por clivagem de DNA, dificuldade da ação de enzimas chave na transdução de sinal ou inibição da angiogénese induzida nos tumores.³⁷

6.4. ATIVIDADE ANTI-BIOFILME

Atualmente, os biofilmes são umas das maiores preocupações, podendo-se desenvolver em qualquer superfície húmida, como condutas de água, cascos de navios, pele e mucosas, próteses, estando também relacionadas com a formação de placa bacteriana.³⁸

O biofilme é uma agregação de microrganismos onde as células aderem umas às outras sobre uma dada superfície. Estas células são fixadas dentro de uma matriz auto-produzida composta por polissacarídeos, DNA e proteínas. O desenvolvimento de biofilmes bacterianos pode causar infeções crónicas pois eles aumentam a resistência das bactérias aos antibióticos e a produtos químicos de desinfeção.³⁸

As actinobactérias do género *Streptomyces* têm sido encaradas como potenciais fontes de compostos anti-biofilme. Até agora, a abordagem mais utilizada no combate aos biofilmes tem sido a utilização de enzimas que possam dissolver a matriz de biofilme, como as DNase I e as α -amilase.³⁸

6.5. ATIVIDADE ANTI-INCRUSTANTE

O *biofouling* refere-se à acumulação indesejável de microrganismos, algas e animais em substratos submersos por água levando à deterioração dos mesmos. O crescimento destes organismos incrustantes, como os mexilhões e outros bivalves em cascos de navios ou gaiolas de aquacultura, por exemplo, tem levantado graves problemas técnicos e financeiros.³⁹

Durante largos anos utilizaram-se tintas à base de tributilestanho (TBT). No entanto a sua utilização foi proibida em 2003 devido à sua toxicidade para o meio ambiente. Como alternativa têm-se usado tintas à base de cobre mas estas continuam a apresentar uma

elevada toxicidade para o ambiente marinho. Desta forma o cobre e outros revestimentos à base de biocidas tóxicos devem ser substituídos por novos compostos eficazes e benignos para o meio ambiente.^{39,40}

Uma das estratégias mais promissoras para encontrar novos produtos anti-incrustantes é a exploração de compostos de defesa química produzidos por organismos marinhos (algas, esponjas, actinobactérias, corais, etc.) que mantêm suas superfícies livres de incrustações.³⁹

7. CONTEXTUALIZAÇÃO E OBJECTIVOS

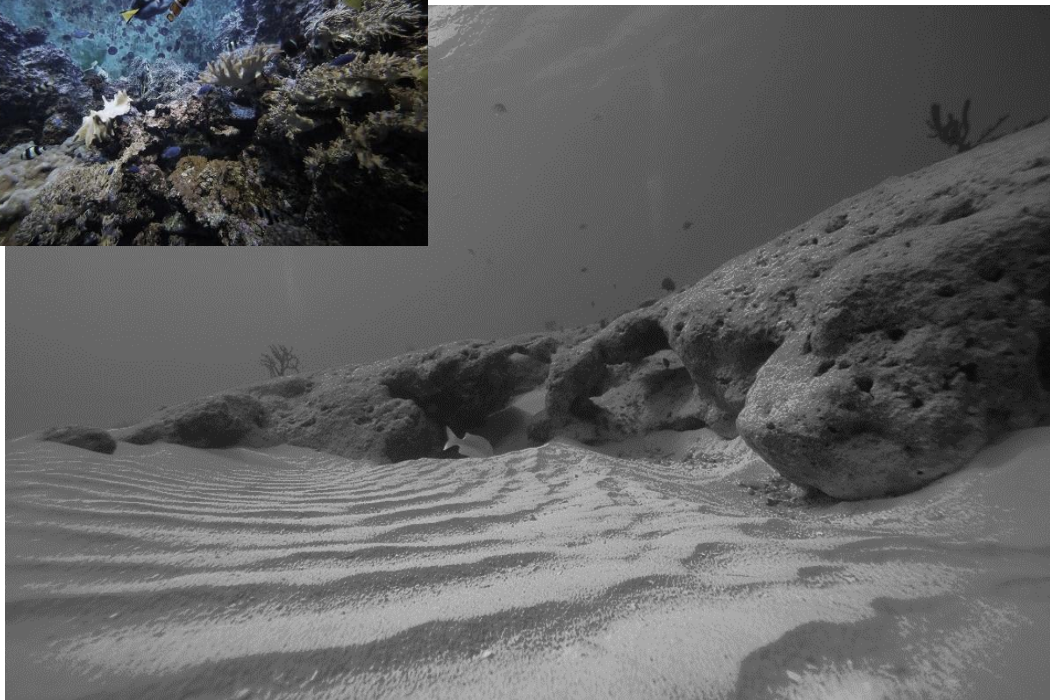
Esta dissertação foi inserida na sequência de trabalhos realizados no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos – Sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioativos” ref. PTDC / QUI-QUI / 119116/2010.

Portugal, com a sua enorme área costeira pouco explorada, dispõe de um elevado potencial para a investigação de novas espécies de actinobactérias e de compostos biologicamente ativos. Desta forma, o objetivo do trabalho é encontrar novos metabolitos secundários bioativos produzidos por uma estirpe de *S. aculeolatus* que possam ter vantagens a nível farmacêutico e industrial. Para tal, os compostos serão testados contra MRSA, VRE, biofilmes clínicos de *S. aureus*, biofilmes marinhos de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e linhas celulares HCT116 do carcinoma do cólon humano. Os metabolitos que apresentem atividade biológica relevante serão posteriormente elucidados através de técnicas 1D e 2D de RMN, espectrometria de massa e IV.

Nesta estudo procedeu-se à realização das seguintes tarefas:

- ❖ Obtenção dos metabolitos secundários (extrato bruto) produzidos por uma cultura de actinobactérias *Streptomyces aculeolatus*, designada PTM-420.
- ❖ Fracionamento cromatográfico do extrato bruto.
- ❖ Isolamento e purificação dos metabolitos secundários produzidos pela estirpe PTM-420.
- ❖ Avaliação da atividade biológica dos compostos isolados.
- ❖ Elucidação estrutural dos compostos através de técnicas 1D e 2D de RMN, HR-MS e IV.

II. MÉTODOS E MATERIAIS



https://www.google.pt/search?q=imagem+fundo+mar&espv=2&biw=1455&bih=722&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjI9L-K2cjPAhWBHBQKHeKECfUQ_AUIBigB#imgsrc=rl_QfCAsx5OYnM%3A

1. MATERIAIS

1.1. SOLVENTES E REAGENTES

Os eluentes utilizados para fracionamento por HPLC (água e ACN) e a água do mar para o crescimento de culturas foram previamente filtrados a vácuo. Todos os restantes solventes e reagentes foram utilizados sem purificação adicional encontrando-se representados na Tabela ii-1, bem como a pureza e marca dos mesmos.

Tabela ii-1 – Marca e pureza dos solventes e produtos químicos utilizados

SOLVENTES/ PRODUTOS QUÍMICOS	MARCA	PUREZA (%)
Sílica Gel 60	Merk 230-400 mesh ASTM	-
Areia do mar lavada	Panreac	-
AcOEt (HPLC)	Prolabo	99,8
Iso-Octano (HPLC)	Prolabo	99,5
MeOH (HPLC)	Prolabo	100
Água (HPLC)	Prolabo	-
ACN (HPLC)	Prolabo	99,9
AcOEt (extrações)	LABCHEM	-
Bicarbonato de sódio	Pronalab	-
Clorofórmio-D	Cambridge Isotope Lab.	≥ 99,8
Clorofórmio	Carlo Erba Reagents	≥ 99
TFA	Sigma-Aldrich	≥ 99,9
THF	Carlo Erba Reagents	≥ 99,9
BHI (<i>Brain Heart Infusion</i>)	Bacto™ Brain Heart Infusion	-
Peptona	Bacto™ Peptone	-
Amido	Difco™ Soluble Starch	-
Extrato de levedura	Bacto™ Yeast Extract	-

1.2. INSTRUMENTAÇÃO

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Utilizou-se um aparelho de HPLC da marca *DIONEX*, modelo *Ultimate 3000*, com detetor de *diode array*.

Espectroscopia de Infra-Vermelho (IV)

Os espectros de FT-IR foram obtidos com um aparelho da marca *Perkin Elmer Spectrum Two*. Utilizaram-se janelas de NaCl e as amostras foram dissolvidas em CHCl_3 .

Espectrometria de Massa de alta resolução (HR-MS)

Os espectros de massa foram obtidos pelo modo HR-ESI-MS (*High Resolution-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, negative ion mode*), sendo que o composto PTM-420-F4-F15 foi também analisado por ESI-TOF-MS (*Electrospray Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry, negative ion mode*). Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos através da aquisição de serviços à *University of California San Diego (UCSD)*, CA, USA, tendo sido utilizado um espectrômetro da marca *Agilent 6230 Accurate-Mass TOFMS*.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN 1D e 2D foram obtidos com um aparelho *Bruker Advance 400 MHz* e um *Bruker BioSpin 600 MHz*, sendo as amostras dissolvidas em CDCl_3 . Para os compostos com massa inferior a 10 mg foram utilizados tubos de RMN de 3 mm. Para compostos com massa superior utilizaram-se tubos de 5 mm de diâmetro.

Espectrofotometria UV/ Visível

A medição da densidade ótica das culturas celulares foi feita num espectrofotômetro de UV/ Visível da marca *Ultraspect 3100 Pro Amersham Biosciences*. Utilizaram-se cuvetes simples de plástico.

Polarimetria

A medição da rotação ótica específica dos compostos foi feita num polarímetro da marca *Bellingham +Stanley*, modelo *ADP410 Polarimeter*, com lâmpada de sódio. A célula utilizada tinha um percurso ótico de 5 dm e 2 mL de volume.

2. COLHEITA, IDENTIFICAÇÃO, CULTIVO E EXTRAÇÃO DA ESTIRPE PTM-420

A partir de amostras de sedimentos recolhidos ao largo do arquipélago da Madeira em Junho de 2012 obteve-se a estirpe PTM-420 que foi isolada em meio de agar A1 (10 g de amido, 4 g de extrato de levedura, 2 g de peptona, 18 g de agar, 0,75 L de água do mar e 0,25 L de água destilada). Verificou-se anteriormente a este trabalho que a estirpe PTM-420 pertence à espécie *Streptomyces acueolatus*, através de sequenciação do gene 16S rRNA.

Foram cultivados 20 L da estirpe PTM-420 em 20 *erlenmeyers* de 2 L de capacidade, utilizando meio líquido A1. As culturas permaneceram a 25°C durante 7 dias, com agitação a 200 rpm. Após este período, procedeu-se à extração do do meio com acetato de etilo, seguido de evaporação à secura para se obter o crude ou extrato bruto.

3. FRACIONAMENTO DO CRUDE

Após a obtenção de 1,020 g de crude procede-se à sua separação em 9 frações de diferentes polaridades, de acordo com uma mistura de eluentes, tabela ii-2.

O fracionamento foi feito por cromatografia *flash* em fase normal colocando-se cerca de 5 cm de sílica gel, variando o diâmetro da coluna de acordo com a massa de crude a separar.⁴¹ As frações foram recolhidas e o eluente evaporado à secura através da utilização de um rota-vapor e linha de vácuo.

Tabela ii-2 - Eluições realizadas na cromatografia *flash*

Nº. FRAÇÕES	% ELUENTES 70 ML
F1	100:0 Isoctano/AcOEt
F2	80:20 Isoctano/AcOEt
F3	60:40 Isoctano/AcOEt
F4	40:60 Isoctano/AcOEt
F5	20:80 Isoctano/AcOEt
F6	100:0 Isoctano/AcOEt
F7	10:90 MeOH/AcOEt
F8	50:50 MeOH/AcOEt
F9	100:0 MeOH/AcOEt

4. ISOLAMENTO DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS POR HPLC

Depois de secas, as frações que revelaram atividade biológica de interesse foram fracionadas por HPLC para isolamento dos seus compostos. Utilizou-se um aparelho de HPLC da marca *DIONEX*, modelo *Ultimate 3000*, com detetor de *diode array*, conforme descrito na secção ii-1.2. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C_{18} , 100 Å, marca *Phenomenex*, modelo 5 μ , 250x10,00 mm. Procedeu-se à injeção de 200 μ L de amostra, utilizando os eluentes H_2O (0,1% TFA)/ ACN (0,1% TFA), nas proporções descritas nas secções iii-2.1 a iii-2.7, com um caudal de 1,5 mL/ min.

As amostras foram diluídas em MeOH ou tetrahidrofurano (THF) na proporção de 1 mg de amostra/ 10 μ L de solvente. Seguidamente procedeu-se à centrifugação da amostra antes da injeção no HPLC.

Devido à utilização de TFA os metabolitos secundários ficaram em meio ácido após o seu isolamento. Foi necessário proceder à neutralização de todas as amostras com uma solução de bicarbonato de sódio a 5%. Depois da neutralização evaporou-se o ACN da amostra, seguindo-se a extração da fase aquosa com acetato de etilo (3 vezes) e e evaporação à secura..Este procedimento várias vezes durante o processo de optimização das condições de eluição para o isolamentos dos compostos das diversas frações.

5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS

A atividade antibacteriana das frações foi previamente testada contra MRSA COL (*Staphylococcus aureus* Resistente à metilina) e VRE EF82 (*Enterococcus faecium* resistente à vancomicina) pelo Mestre Tiago Dias. Para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) das frações foram utilizadas duas estirpes multi-resistentes, MRSA COL e VRE EF82. As frações foram testadas na concentração de 10 mg/ mL em DMSO.

Neste trabalho foram testados 66 compostos contra MRSA COL e VRE EF82. Num tubo *falcon* adicionou-se aproximadamente 5 mL de meio de cultura BHI (37 g/L) onde se inoculou a estirpe MRSA, tendo ficado a incubar a 37°C durante a noite. Após este período de tempo o tubo *falcon* foi colocado em gelo para parar o crescimento bacteriano e foi medida a densidade ótica a 600 nm (DO_{600}). Para tal fizeram-se diluições de 1:100 com meio BHI, sendo que o valor ideal de absorvância está compreendido entre 0,04-0,06.

Alíquotas de cultura com a DO₆₀₀ pretendida foram distribuídas numa placa de 96 poços, bem como 5 µL de cada amostra a testar, e os controlos DMSO e solução de vancomicina (1 mg/ mL), e meio de cultura BHI, figura ii-1. O DMSO foi utilizado para controlar a viabilidade da cultura sem os compostos estarem a afetar a mesma, a solução de vancomicina serviu para controlar a inibição do crescimento celular da estirpe de MRSA COL, o meio BHI foi utilizado para controlar a esterilidade do processo e a cultura adicionada no poço G11 serviu para controlar o crescimento bacteriano sem qualquer suplemento (vancomicina, DMSO ou compostos testados).

Após o preenchimento dos poços como retratado na figura ii-1 com uma micropipeta multicanal foram retirados 100 µL dos poços da fila A até à posição 10, diluindo-se na fila B e assim sucessivamente até à última fila. Desta forma criou-se o seguinte fator de diluição dos compostos para metade: 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 3,91, 1,95, 0,98 e 0,49 µg/ mL, da fila A até à H, respetivamente.

A placa foi incubada a 37°C durante a noite sendo os resultados registados a 18 a 24 horas. No registo dos resultados foi observada a diferença de turbidez da cultura em cada poço, sendo comparada com o poço G11 e o poço G12, com meio BHI.

Este procedimento foi idêntico para a avaliação da atividade de cada composto isolado e contra a estirpe VRE EF82.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (estrato)	195 µl (cultura) 5 µl (DMSO)	195 µl (cultura) 5 µl (Vancom)
B	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)		
C	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)		
D	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)		
E	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)		
F	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)	100 µl (cultura)		
G											100 µl (cultura)	100 µl (BHI)
H												

Figura ii-1 - Volumes das culturas bacterianas, compostos testados, solução de DMSO e solução de vancomicina colocados nas placas de 96 poços

6. DETERMINAÇÃO DE OUTRAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS

A atividade anticancerígena contra as linhas celulares HCT116 do carcinoma do cólon humano foi determinada no grupo da Professora Cecília Rodrigues, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

A atividade antibiofilme para fins clínicos contra uma estirpe de *S. aureus* foi determinada pela mestranda Sofia Silva, a desenvolver trabalho no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos” paralelamente, no laboratório de Genética Procariotas da FCT-UNL, com o apoio da Prof.a Rita Sobral.

Por último, a atividade anti-*macrobiofouling* contra larvas de mexilhão da espécie *mytilus galloprovincialis* foi testada pela Doutora Isabel Cunha, no CIIMAR (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental), Porto. A actividade contra biofilmes marinhos produzidos pela bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* foi testada pela mestranda Helena Macedo, também no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos”, também no de Genética Procariotas da FCT-UNL, com o apoio da Professora Rita Sobral.

7. TÉCNICAS DE RMN USADAS

Os compostos que apresentaram atividade biológica relevante foram posteriormente elucidados através de técnicas espectroscópicas de RMN1D e 2D:

- ^1H

- ^{13}C

- **COSY**: (*Correlated Spectroscopy*) correlação ^1H - ^1H entre prótons vizinhos.

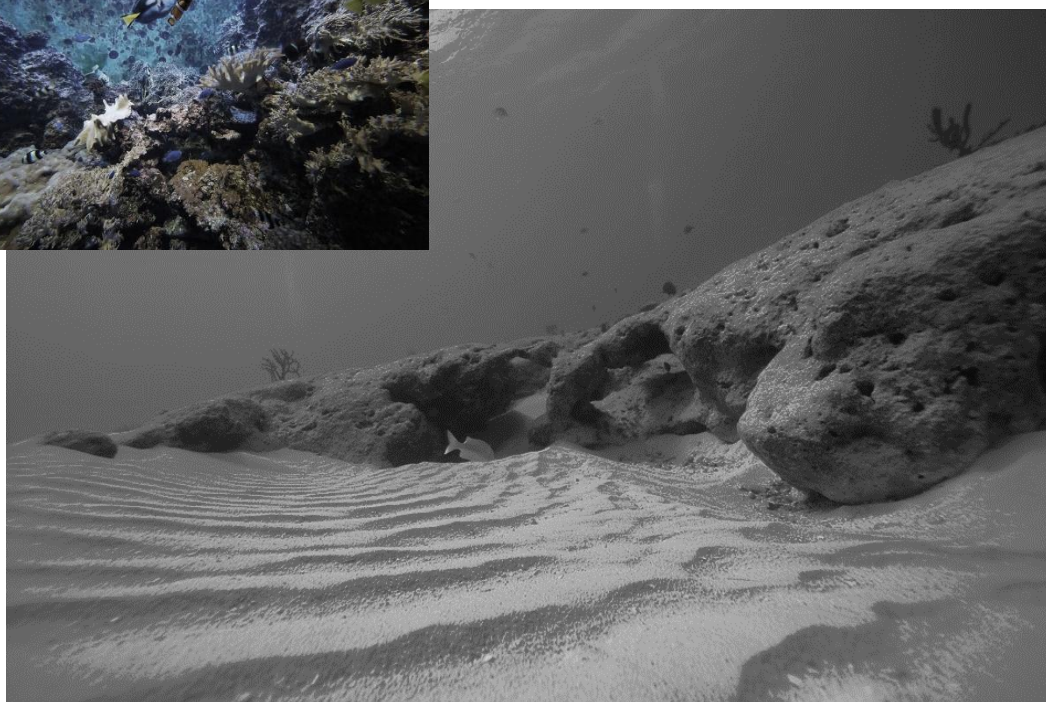
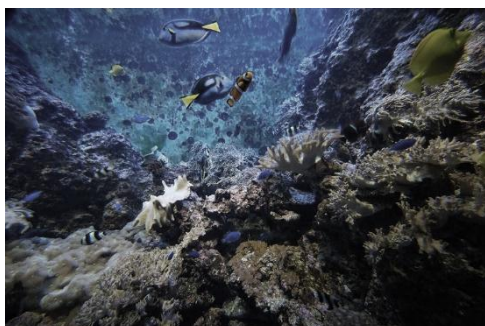
- **TOCSY**: (*Total Correlated Spectroscopy*) correlação ^1H - ^1H até três ligações.

- **NOESY**: (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) o espectro obtido é semelhante ao COSY, no entanto os prótons são correlacionados espacialmente.

- **HMBC**: (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) dá a correlação ^{13}C - ^1H entre átomos separados até três ligações e, por vezes até quatro ligações em sistemas π .

- **HSQC:** (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) correlaciona ^1H - ^{13}C diretamente ligados entre si.
- **1,1-*Adequate*:** correlação entre ^1H - ^{13}C a duas ligações de distância.
- **HSQC-TOCSY editado:** combinação de um espectro de HSQC com o TOCSY para originar correlações entre ^{13}C com os prótons acoplados. Útil quando se analisam espectros de prótons complexos onde existem muita sobreposição de sinal.
- **H2BC:** (*Heteronuclear Two Bond Correlation*) mostra correlações entre ^{13}C - ^1H até duas ligações de distância. A aquisição deste espectro é semelhante à de um **1,1-*Adequate***, mas o tempo de mistura é mais curto.
- **DEPT 90:** (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) apenas os carbonos CH aparecem no espectro.
- **DEPT 135:** permite distinguir a multiplicidade dos carbonos: CH_2 serão negativos no espectro, enquanto CH e CH_3 positivos.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO



https://www.google.pt/search?q=imagem+fundo+mar&espv=2&biw=1455&bih=722&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjI9L-K2cjPAhWBHBQKHeKECfUQ_AUIBigB#imgsrc=rl_QfCAsx5OYnM%3A

1. FRACIONAMENTO DO CRUDE: MASSA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Na tabela iii-1 estão apresentadas as massas e as atividades biológicas das frações resultantes da PTM-420. As mesmas foram posteriormente separadas por HPLC com a finalidade de se obterem os compostos puros, pois todas as frações revelaram atividade antibacteriana. Verificou-se que as frações F2, F3 e F4 foram as que apresentaram maior atividade antimicrobiana contra MRSA COL e VRE EF82.

Tabela iii-1 - Massa e atividades biológicas das frações obtidas do crude PTM-420

FRAÇÃO	MASSA (mg)	<u>ATIVIDADES BIOLÓGICAS</u>		
		ANTIBACTERIANA MIC (µg/mL)		ANTICANCERÍGENA IC ₅₀ (µg/mL)
		MRSA	VRE	
F2	11,3	1,56	15,6	NA
F3	150,8	3,91	3,91	NA
F4	386,3	3,91	3,91	NA
F5	158,1	15,6	0	2,95
F6	63,7	7,81	0	NA
F7	174,4	250	15,6	NA
F8	118,2	250	62,5	NA
F9	24,2	250	125	NA

NA: Não ativo

Devido à baixa quantidade de massa obtida para a fração F2 (m= 11,3 mg) e ao facto de apresentar um perfil de UV idêntico (dados de LC-MS) à fração F3 decidiu-se combinar as mesmas antes da realização do fracionamento por HPLC. Procedeu-se de igual forma em relação às frações F8 e F9.

2. ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS POR HPLC

Como referido no ponto 4 dos Métodos e Materiais, para cada fração foi necessário otimizar as condições de eluição no HPLC. Verificou-se a necessidade da utilização de 0,1% TFA pois os compostos eram bastante apolares..

Relativamente aos comprimentos de onda máximos, estes foram seleccionados a partir de dados de LC-MS.

Nos seguintes pontos encontram-se apresentadas as condições de eluição para cada fração, as massas dos compostos isolados e a sua atividade biológica.

2.1. FRAÇÕES 2+3: MASSAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Tabela iii-2 - Condições de eluição para a fração F2+F3 (cromatograma no anexo vii-2)

<u>Tempo (min.)</u>	<u>% ACN/ 0,1% TFA</u>	<u>λ (nm) UV</u>
0	70	210
50	70	250
51	90	290
80	90	335
90	100	

Do fracionamento da fração F2+F3 isolaram-se 17 compostos, dos quais 14 pertenciam à família napiradiomicina, pela análise dos seus perfis UV. Os compostos PTM-420-F2+F3-F20, PTM-420-F2+F3-F22, PTM-420-F2+F3-F25, PTM-420-F2+F3-F27, PTM-420-F2+F3-F35 e PTM-420-F2+F3-F39 seguiram para elucidação estrutural devido a apresentarem percentagens superiores a 60% para a inibição de biofilmes da estirpe *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, (tabela III-3). Devido à pouca quantidade de massa obtida para os compostos PTM-420-F2+F3-F25 e PTM-420-F2+F3-F27, 2,06 e 1,43 mg, respetivamente, procedeu-se ao crescimento de mais 20 L de cultura da estirpe PTM-420. Desta vez o composto PTM-420-F2+F3-F27 não foi produzido e o PTM-420-F2+F3-F25 foi produzido em baixa quantidade, tendo sido insuficiente para obter boa resolução dos espectros de RMN.

Tabela iii-3 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F2+F3

COMPOSTO F2+F3,	MASSA (mg)	ANTIBACTERIANA ($\mu\text{g/mL}$)		BIOFILMES			
				Clínicos (<i>S. aureus</i>)		Marinhos (<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>)	
		MRSA	VRE	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	% inibição Máx.	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
F3	1,52	NA	250	-	-	-	-
F7	1,13	250	250	-	-	-	-
F8	0,94	NA	NA	-	-	-	-
F12	1,74	31,21	62,5	-	-	78	1,95
F13	1,76	125	62,5	-	-	-	-
F17	2,18	NA	NA	-	-	-	-
F18	1,88	NA	NA	-	-	75,8	0,98
F20	5,04	125	62,5	-	-	67,7	3,90
F21	15,19	250	125	-	-	-	-
F22	11,36	125	125	-	-	84,5	3,9
F23	4,72	125	62,5	-	-	-	-
F25	2,06	62,5	31,21	-	-	61,9	31,25
F27	1,43	62,5	31,21	-	-	64,5	0,98
F33	2,91	250	NA	-	-	-	-
F35	12,86	7,71	31,21	-	-	70,9	0,98
F37	2,76	62,5	62,5	-	-	-	-
F39	5,21	62,5	31,21	-	-	72,4	3,90

NA: Sem atividade

-: Não testado

2.2. FRAÇÃO 4: MASSAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Tabela iii-4 – Condições de eluição para a fração F4 (cromatograma no anexo vii-2)

<u>Tempo (min.)</u>	<u>% ACN/ 0,1% TFA</u>	<u>λ (nm) UV</u>
0	70	210
50	70	250
51	90	290
80	90	335
90	100	

Na fração 4 foram isolados 14 compostos dos quais 10 pertenciam à família napiradiomicina, pela análise dos seus perfis UV. Seguiu para elucidação o composto PTM-420-F4-F25 devido a este apresentar uma atividade anti-*biofouling* relevante, onde inibe a presença de biofilmes em 63,8% com um MIC de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, tabela iii-5. Como foi isolada uma quantidade elevada deste composto, o mesmo irá prosseguir para aplicações industriais.

O composto PTM-420-F4-F15 inibiu a presença de biofilmes marinhos em 64,8% com um MIC de 0,98 $\mu\text{g/mL}$, estando a ser elucidado. Acredita-se pertencer a uma nova família de macrólidos que será discutida na secção 5.

Serão também elucidados os compostos PTM-420-F4-F40 e PTM-420-F4-F44 pois revelaram serem bastante ativos contra MRSA COL, tabela iii-5.

Tabela iii-5 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F4

COMPOSTO F4,	MASSA (mg)	ANTIBACTERIANA ($\mu\text{g/mL}$)		BIOFILMES			
				Clínicos (<i>S. aureus</i>)		Marinhos (<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>)	
		MRSA	VRE	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
F5	11,52	NA	NA	-	-	-	-
F6	10,14	NA	NA	-	-	-	-
F8	6,11	NA	NA	-	-	-	-
F10	12,28	NA	NA	-	-	-	-
F15	8,81	NA	NA	-	-	64,8	0,98
F16	7,91	NA	250	-	-	-	-
F19	11,52	NA	NA	-	-	-	-
F23	34,85	NA	250	-	-	-	-
F24	28,34	250	250	-	-	-	-
F25	25,69	125	125	-	-	63,8	31,25
F27	15,43	NA	NA	-	-	-	-
F38	15,83	NA	NA	-	-	-	-
F40	29,59	3,9	31,21	-	-	-	-
F44	12,83	7,81	15,63	-	-	-	-

NA: Sem atividade

-: Não testado

2.3. FRAÇÃO 5: MASSAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Tabela iii-6 - Condições de eluição para a fração F5 (cromatograma no anexo vii-2)

<u>Tempo (min.)</u>	<u>% ACN/ 0,1% TFA</u>	<u>λ (nm) UV</u>
0	25	210
30	25	250
31	60	290
65	60	350
120	90	
121	100	
135	100	

Verificou-se que a fração 5 era composta por duas fases imiscíveis, uma delas insolúvel em MeOH. Neste caso foi necessário adicionar tetrahidrofurano para solubilizar todos os compostos, a fim de serem injetados no HPLC.

Na fração 5 isolaram-se 21 dos quais 15 pertenciam à família napiradiomicina, pela análise dos seus perfis UV. Selecionou-se para elucidação estrutural os compostos PTM-420-F5-F31, PTM-420-F5-F38, PTM-420-F5-F42, PTM-420-F5-F43, PTM-420-F5-F45 e PTM-420-F5-F47 pois apresentam uma elevada atividade contra os biofilmes clínicos de *S. aureus* com percentagens de inibição superiores a 60%, tabela iii-7, tendo-se verificado que pertencem todos a uma nova família de macrólidos. Apesar de não apresentar atividade significativa, o composto 44 seguiu também para elucidação devido à sua relação de eluição com os compostos descritos e também pela semelhança do perfil UV com os mesmos, indicando pertencer à mesma família, anexos vii-13.

O composto 56 não foi selecionado para elucidação porque apesar de ter uma grande percentagem de inibição dos biofilmes, inibia também o crescimento bacteriano, o que não é desejável.

Com o intuito de obter melhores espectros de RMN tornou-se a crescer 20 L de cultura da estirpe PTM-420 e repetiu-se o isolamento desta família de compostos. Os compostos foram isolados sob as mesmas condições cromatográficas, tendo tempos de retenção idênticos e apresentaram o perfil UV característico. No entanto, os espectros de RMN mostraram um perfil diferente, anexo vii-16 e vii-17.

Tabela iii-7 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F5

COMPOSTO F5,	MASSA (mg)	ANTIBACTERIANA ($\mu\text{g/mL}$)		BIOFILMES			
				Clínicos (<i>S. aureus</i>)		Marinhos (<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>)	
		MRSA	VRE	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
F4	1,17	-	-	-	-	-	-
F8	1,46	NA	NA	-	-	-	-
F11	1,13	NA	NA	-	-	-	-
F12	0,93	-	-	-	-	-	-
F16	3,23	-	-	46,39	0,98	-	-
F20	3,99	NA	NA	37,31	0,98	-	-
F22	2,67	NA	NA	35,67	7,81	-	-
F23	2,11	NA	250	-	-	-	-
F25	2,15	NA	250	39,95	1,95	-	-
F31	1,78	125	7,81	80	1,95	-	-
F36	3,06	125	31,21	65	0,98	-	-
F38	1,72	125	31,21	71	0,98	-	-
F42	2,19	250	7,81	80	1,95	-	-
F43	2,83	125	31,21	65	7,81	-	-
F44	3,62	125	125	6,87	7,81	-	-
F45	3,54	62,5	125	62	15,63	-	-
F47	1,88	250	250	66	7,81	-	-
F49	1,88	250	250	47,65	1,95	-	-
F53	1,48	-	-	-	-	-	-
F55	2,90	62,5	3,9	-	-	-	-
F56	2,23	31,21	1,95	98,67	0,98	-	-

NA: Sem atividade

-: Não testado

2.4. Fração 6: massas e atividades biológicas dos compostos isolados

Tabela iii-8 - Condições de eluição para a fração F6 (cromatograma no anexo vii-2)

<u>Tempo (min.)</u>	<u>% ACN/ 0,1% TFA</u>	<u>λ (nm) UV</u>
0	10	210
20	10	250
21	25	290
40	25	350
60	90	
70	90	
71	100	
100	100	

Apesar de terem sido isolados 24 compostos, 15 pertencentes à família napiradiomicina pela análise dos perfis UV, a fração 6 não foi alvo de um estudo exaustivo pois não se realizaram ensaios biológicos para compostos com menos de 1 mg, visto não se conseguir realizar a elucidação estrutural com tão baixa quantidade.

É de salientar o composto PTM-420-F6-F44 pois apresentou atividade significativa contra MRSA COL e VRE EF82 (MIC de 1,95 $\mu\text{g/mL}$), tendo sido isolados 2,46 mg o que permite a sua elucidação (tabela III-9). Apesar do composto PTM-420-F6-F44 apresentar uma percentagem de 99,97 % para os biofilmes clínicos, o mesmo não prosseguiu para elucidação pois para além de inibir os biofilmes, inibia também o crescimento bacteriano.

Tabela iii-9 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F6

COMPOSTO F6,	MASSA (mg)	ANTIBACTERIANA ($\mu\text{g/mL}$)		BIOFILMES			
				Clínicos (<i>S. aureus</i>)		Marinhos (<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>)	
		MRSA	VRE	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
F4	0,84	-	-	-	-	-	-
F7	0,24	-	-	-	-	-	-
F8	0,43	-	-	-	-	-	-
F11	1,55	NA	NA	3,45	1,95	-	-
F13	0,38	-	-	-	-	-	-
F14	0,74	-	-	-	-	-	-
F15	4,15	NA	NA	6,99	1,95	-	-
F17	2,57	NA	NA	NA	NA	-	-
F18	0,53	-	-	-	-	-	-
F19	0,47	-	-	-	-	-	-
F22	0,2	-	-	-	-	-	-
F27	0,46	-	-	-	-	-	-
F29	0,61	-	-	-	-	-	-
F31	0,68	-	-	-	-	-	-
F33	1,58	NA	250	28,81	7,81	-	-
F34	0,75	-	-	-	-	-	-
F36	0,72	-	-	-	-	-	-
F37	0,59	-	-	-	-	-	-
F39	0,7	-	-	-	-	-	-
F41	0,42	-	-	-	-	-	-
F43	0,81	-	-	-	-	-	-
F44	2,46	1,95	1,95	99,97	3,91	-	-
F46	0,6	-	-	-	-	-	-
F48	0,92	-	-	-	-	-	-

NA: Sem atividade

-: Não testado

2.5. FRAÇÃO 7: MASSAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Tabela iii-10 - Condições de eluição para a fração F7 (cromatograma no anexo vii-2)

<u>Tempo (min.)</u>	<u>% ACN/ 0,1% TFA</u>	<u>λ (nm) UV</u>
0	10	210
20	10	250
21	25	290
40	25	350
60	90	
70	90	
71	100	
100	100	

Foram isolados 17 compostos da fração 7, sendo que 15 pertencem à família napiradiomicina pela análise do perfil UV. Estes compostos não foram alvo de estudo por não apresentarem atividades biológicas relevantes e também quantidade suficiente para elucidação estrutural (tabela iii-11).

Tabela iii-11 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F7

COMPOSTO F7,	MASSA (mg)	ANTIBACTERIANA ($\mu\text{g/mL}$)		BIOFILMES			
				Clínicos (<i>S. aureus</i>)		Marinhos (<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>)	
		MRSA	VRE	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
F3	0,46	-	-	-	-	-	-
F5	1,08	NA	NA	NA	NA	-	-
F6	0,34	-	-	-	-	-	-
F8	0,63	-	-	-	-	-	-
F11	1,9	NA	NA	NA	NA	-	-
F12	3,03	NA	NA	NA	NA	-	-
F14	1,83	NA	NA	NA	NA	-	-
F16	1,92	NA	NA	NA	NA	-	-
F18	1,48	NA	NA	34,21	0,98	-	-
F20	0,73	NA	NA	-	-	-	-
F21	1,53	NA	NA	49,76	7,81	-	-
F22	0,98	-	-	-	-	-	-
F24	0,99	31,21	15,63	31,43	1,95	-	-
F27	1,44	NA	NA	4,95	15,625	-	-
F29	1,45	NA	NA	17,71	1,95	-	-
F37	1,34	NA	NA	57,1	1,95	-	-
F39	1,92	NA	NA	65,41	1,95	-	-

NA: Sem atividade

-: Não testado

2.7. FRAÇÃO 8+9: MASSAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Tabela iii-12 - Condições de eluição para a fração F8+F9 (cromatograma no anexo vii-2)

<u>Tempo (min.)</u>	<u>% ACN/ 0,1% TFA</u>	<u>λ (nm) UV</u>
0	10	210
15	10	250
16	40	290
35	40	350
36	100	
60	100	

Do isolamento das frações F8+F9 resultaram 11 compostos, sendo que 6 pertencem à família napiradiomicina pela análise do perfil UV. O composto PTM-420-F8+F9-F29 será alvo de estudo pois apresentou um MIC de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ contra VRE EF82, tendo sido isolados 6,06 mg o que permite prosseguir para elucidação estrutural (tabela iii-13).

Tabela iii-13 - Massas e atividades biológicas dos compostos isolados da fração F8+F9

COMPOSTO F8+F9,	MASSA (mg)	ANTIBACTERIANA ($\mu\text{g/mL}$)		BIOFILMES			
				Clínicos (<i>S. aureus</i>)		Marinhos (<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>)	
		MRSA	VRE	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	% inibição	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
F3	0,64	-	-	-	-	-	-
F6	0,31	-	-	-	-	-	-
F7	0,1	-	-	-	-	-	-
F9	1,3	NA	NA	28,68	1,95	-	-
F11	0,96	-	-	-	-	-	-
F14	0,85	-	-	-	-	-	-
F18	1,15	-	-	-	-	-	-
F20	6,64	NA	250	48,46	0,98	-	-
F21	0,95	-	-	-	-	-	-
F22	3,03	NA	250	32,78	0,98	-	-
F23	1,06	NA	NA	-	-	-	-
F27	0,4	-	-			-	-
F29	6,06	62,5	7,81	41,50	15,63	-	-

NA: Sem atividade

-: Não testado

3. DADOS ESPECTROSCÓPICOS E ESPECTROMÉTRICOS DOS COMPOSTOS

3.1. PTM-420-F2+F3+F20

As técnicas de RMN usadas para a elucidação do composto PTM-420-F2+F3-F20 foram ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, DEPT 135, DEPT 90, HSQC, HMBC e NOESY, obtendo-se também espectros de IV e HR-MS, anexos vii-3).

Esta estrutura já tinha sido refortada, denominando-se 18-hidroxinapiradiomicina A1,¹³ estrutura apresentada na figura iii-1.

PTM-420-F2+F3-F20:

Goma alaranjada (5,04 mg); R_T : 36,5 min.; **UV máx (nm)**: 197,7, 252,4, 361,3; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)**: δ 11,98 (t, 1H, 7-OH), 7,13 (s, 1H, H-4), 6,71 (br s, 1H, H-6), 5,28 (m, 1H, H-19), 4,90 (t, 1H, J= 7,7 Hz, H-15), 4,47 (m, 1H, H-12), 4,19 (d, 1H, J= 12.9 Hz, H-21), 4.09 (d, 1H, J= 12.5 Hz, H-21), 2,73 (m, 1H, H-14), 2,52 (m, 2H, H-11, H14), 2,41 (m, 1H, H-11), 1,89 (m, 4H, H-17, H-19), 1,64 (s, 3H, H-25), 1,50 (s, 3H, H-23), 1,23 (s, 6H, H-22, H-24); **^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3)**: δ 194,68 (qC, C-2), 193,72 (qC, C-9), 165,28 (qC, C-5), 165,08 (qC, C-7), 139,70 (qC, C-16), 134,80 (qC, C-3), 133,69 (qC, C-20), 126,69 (CH, C-19), 116,87 (CH, C-15), 109,47 (CH, C-6), 108,9 (qC, C-8), 108,20 (CH, C-4), 84,46 (qC, C-1), 79,07 (qC, C-10), 78,86 (qC, C-13), 69,10 (CH_2 , C-21), 58,74 (CH, C-12), 42,41 (CH_2 , C-11), 40,48 (CH_2 , C-14), 38,67 (CH_2 , C-17), 29,08 (CH_3 , C-23), 24,81 (CH_3 , C-18), 22,22 (CH_3 , C-22), 15,73 (CH_3 , C-24), 13,78 (CH_3 , C-25); **IV NaCl ν_{max} (cm^{-1})**: 3100 (OH), 1615,34 (C=O), 1259,18 (C-OH aromático), 757,79 (C-Cl); **HR-MS m/z** 495,1349 (calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{O}_6$, $[\text{M}-\text{H}]^-$ 495,1347); $[\alpha]_D^{32}$ -33 (c= 0,18g/100 mL, CHCl_3).

3.2. PTM-420-F2+F3-F35

As técnicas de RMN usadas para a elucidação do composto PTM-420-F2+F3-F35 foram ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, DEPT 135, DEPT 90, HSQC, HMBC e NOESY, obtendo-se também espectros de IV e HR-MS, anexos vii-4).

Esta estrutura já tinha sido refortada, denominando-se napiradiomicina A1,¹⁶ estrutura apresentada na figura iii-2.

PTM-420-F2+F3-F35:

Goma alaranjada (12,86 mg); R_T : 71,9 min.; **UV máx. (nm)**: 200,5, 251,1, 360,4; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)**: δ 11,98 (s, 1H, 7-OH), 7,22 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H-4), 6,74 (d, 1H, J = 1,7 Hz, H-6), 4,89 (m, 1H, H-19), 4,71 (t, 1H, J = 8,1 Hz, H-15), 4,42 (dd, 1H, J = 11,4 Hz, J = 4,5 Hz, H-12), 2,70 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H-14), 2,46 (m, 2H, H-11), 1,64 (m, 5H, H-17, H-25), 1,50 (s, 6H, H-22, H-25), 1,31 (s, 3H, H-24), 1,18 (s, 3H, H-23); **^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3)**: δ 196,27 (qC, C-2), 193,78 (qC, C-9), 167,68 (qC, C-7), 164,73 (qC, C-5), 142,85 (qC, C-16), 135,16 (qC, C-3), 131,76 (qC, C-20), 123,67 (CH, C-19), 114,89, (CH, C-15), 110,20 (qC, C-8), 109,57 (CH, C-6), 107,77 (CH, C-4), 83,51 (qC, C-1), 78,93 (qC, C-13), 78,78 (qC, C-10), 58,74 (CH, C-12), 42,68 (CH₂, C-11), 41,29 (CH₂, C-14), 39,72 (CH₂, C-17), 28,74 (CH₃, C-22), 25,91 (CH₂, C-18), 25,63 (CH₃, C-21), 22,24 (CH₃, C-23), 17,54 (CH₃, C-25), 16,44 (CH₃, C-24); **IV NaCl ν_{max} (cm^{-1})**: 3341,13 (OH), 1614,99 (C=O), 1450,10 (H₂C-C=C), 2984,33 e 2929,27 (C-H alcanos), 759,56 (C-Cl); **HR-MS m/z** 479,1400 (calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{O}_5$, $[\text{M-H}]^-$ 479,1398).

3.3. PTM-420-F2+F3-F22

As técnicas de RMN usadas para a elucidação do composto PTM-420-F2+F3-F22 foram ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, DEPT 135, DEPT 90, HSQC, HMBC e NOESY, obtendo-se também espectros de IV e HR-MS, anexos vii-5).

Esta estrutura já tinha sido refortada, denominando-se napiradiomicina A2b,¹³ estrutura apresentada na figura iii-3.

PTM-420-F2+F3-F22:

Goma alaranjada (11,36 mg); R_T : 40,3 min.; **UV máx. (nm)**: 197,9, 251,8, 361,1; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)**: δ 11,94 (s, 1H, 7-OH), 7,32 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-4), 6,75 (s, 1H, H-6), 4,91 (d, 2H, $J = 37$ Hz, H-21), 4,76 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-15), 4,45 (dd, 1H, $J = 11,8$ Hz, $J = 3,8$ Hz, H-12), 4,03 (t, 1H, $J = 6,4$ Hz, H-19), 2,81 (m, 1H, H-14), 2,48 (m, 3H, H-11, H-14), 1,82 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, H-17), 1,71 (s, 3H, H-25), 1,51 (s, 3H, H-23), 1,35 (m, 5H, H-18, H-24), 1,19 (s, 3H, H-22); **^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3)**: δ 196,13 (qC, C-2), 193,70 (qC, C-9), 165,24 (qC, C-5, C-7), 146,46 (qC, C-20), 141,54 (qC, C-16), 134,76 (qC, C-3), 116,52 (CH, C-15), 111,97 (CH₂, C-21), 110,16 (CH, C-6), 109,39 (qC, C-8), 108,52 (CH, C-4), 84,30 (qC, C-1), 79,26 (qC, C-13), 79,10 (qC, C-10), 75,39 (CH, C-19), 58,77 (CH, C-12), 42,69 (CH₂, C-11), 40,22 (CH₂, C-14), 35,86 (CH₂, C-17), 31,85 (CH₂, C-18), 29,05 (CH₃, C-23), 22,38 (CH₃, C-22), 17,88 (CH₃, C-25), 16,11 (CH₃, C-24); **IV NaCl ν_{max} (cm^{-1})**: 3300 (OH), 1615,34 (C=O), 757,79 (C-Cl), 1386,13 e 1371,64 (CH₃ alcano); **HR-MS m/z** 495,1346 (calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{O}_6$, $[\text{M}-\text{H}]^-$, 495,1347; $[\alpha]_{\text{D}}^{32} -19$ ($c = 0,42\text{g}/100\text{ mL}$, CHCl_3).

Através da elucidação estrutural do composto PTM-420-F4-F25 verificou-se que este tem uma estrutura igual ao PTM-420-F2+F3-F22. Apesar de estarem em frações diferentes, foram eluídos com as mesmas condições e um tempo de retenção semelhante. Os espectros encontram-se no anexo vii-6.

3.4. PTM-420-F2+F3-F39

Com o mesmo tempo de retenção resultou uma mistura de dois compostos muito semelhantes: PTM-420-F2+F3-F39A e PTM-420-F2+F3-F39B, cujas elucidações foram feitas separadamente.

As técnicas de RMN usadas para a elucidação do composto PTM-420-F2+F3-F35 foram ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, DEPT 135, DEPT 90, HSQC, HMBC e NOESY, obtendo-se também espectros de IV e HR-MS, anexos vii-7).

Ambas as estruturas elucidadas já tinham sido reportadas na literatura sendo conhecidas como napiradiomicina B⁴² e Napiradiomicina 5⁴³, estruturas apresentadas na figura iii-4 e figura iii-5, respetivamente.

3.4.1. PTM-420-F2+F3-F39A:

Goma alaranjada (5,21 mg); R_T : 81,5 min.; **UV máx. (nm)**: 196,1, 252,2, 357,6; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)**: δ 12,04 (s, 1H, 7-OH), 7,13 (d, 2H, J = 5,3 Hz, H-4), 6,72 (d, 2H, J = 13,1 Hz, H-6), 4,77 (d, 2H, J = 6,6 Hz, H-21), 4,45 (dd, 2H, J = 11,0, 2,8 Hz, H-12), 4,05 (td, 2H, J = 20,1, 4 Hz, H-19), 2,66 (m, 2H, H-14), 2,52 (dd, J = 14,0, 3,9 Hz, H-11), 2,30 (m, 2H, H-11), 2,21 (m, 4H, H-17, H-18), 2,05 (m, 2H, H-15), 1,92 (m, 4H, H-17, H-18), 1,61 (d, 2H, J = 16 Hz, H-14), 1,37 (s, 3H, H-22), 1,19 (s, 3H, H-23), 0,72 (s, 3H, H-24), 0,62 (s, 3H, H-25); **^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3)**: δ 195,05 (qC, C-9), 193,57 (qC, C-2), 165,58 (qC, C-7), 163,83 (qC, C-5), 145,70 (qC, C-16), 135,16 (qC, C-3), 110,35 (CH_2 , C-21), 109,58 (qC, C-8), 109,17 (CH, C-6), 108,64 (CH, C-4), 84,36 (qC, C-1), 81,01 (qC, C-10), 78,91 (qC, C-13), 66,85 (CH, C-19), 58,87 (CH, C-12), 45,84 (CH, C-15), 42,81 (CH_2 , C-11), 41,94 (qC, C-20), 37,44 (CH_2 , C-17), 36,03 (CH_2 , C-18), 35,47 (CH_2 , C-14), 29,09 (CH_3 , C-22), 27,92 (CH_3 , C-24), 22,55 (CH_3 , C-23), 16,45 (CH_3 , C-25); **IV NaCl ν_{max} (cm^{-1})**: 3321,45 (OH), 2933,19 e 2980,36 (C-H alcanos), 1703,09 (C=C), 1619,64 (C=O), 1260,41 (C-OH), 756,03 (C-Cl); **HR-MS m/z** 557,0503 (calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{BrCl}_2\text{O}_5$, $[\text{M-H}]^+$, 557,0503).

3.4.2. PTM-420-F2+F3-F39B:

Goma alaranjada (5,21 mg); R_T : 81,5 min.; **UV máx. (nm)**: 196,1, 252,2, 357,6; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)**: δ 12,58 (s, 7-OH), 7,13 (d, 2H, J = 5,3 Hz, H-4), 6,87 (d, 1H, 1,6 Hz, H-11), 6,72 (d, 2H, J = 13,1 Hz, H-6), 4,82 (s, 1H, H-21), 4,45 (dd, 2H, J = 11,0, 2,8 Hz, H-12), 4,30 (s, 1H, H-21), 4,05 (td, 2H, J = 20,1, 4 Hz, H-19), 2,21 (m, 2H, H-14, H-18), 2,05 (m, 2H, H-14), 1,92 (m, 4H, H-17, H-18), 1,53 (s, 4H, H-22), 1,08 (s, 6H, H-23, H-24), 0,66 (s, 3H, H-25); **^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3)**: δ 194,06 (qC, C-2), 188,52 (qC, C-9), 165,83 (qC, C-7), 164,36 (qC, C-5), 145,34 (qC, C-16), 137,02 (CH, C-11), 136,90 (qC, C-10), 135,79 (qC, C-3), 111,64 (qC, C-8), 109,58 (CH_2 , C-21), 109,17 (CH, C-6), 108,49 (CH, C-4), 82,39 (qC, C-1), 76,66 (qC, C-13), 66,43 (CH, C-19), 59,56 (CH, C-12), 48,07 (CH, C-15), 42,18 (qC, C-20), 37,61 (CH_2 , C-17), 36,03 (CH_2 , C-14), 35,99 (CH_2 , C-18), 28,45 (CH_3 , C-25), 27,25 (CH_3 , C-22), 20,38 (CH_3 , C-23), 16,60 (CH_3 , C-24); **IV NaCl ν_{max} (cm^{-1})**: 3321,45 (OH), 2933,19 e 2980,36 (C-H alcanos), 1703,09 (C=C), 1619,64 (C=O), 1260,41 (C-OH), 756,03 (C-Cl); **HR-MS m/z** 521,0738 (calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{BrClO}_5$, $[\text{M-H}]^+$, 521,0738).

3.5. FAMÍLIA DE MACRÓLIDOS

Neste trabalho verificou-se a existência de uma nova família de macrólidos. As suas estruturas ainda não estão completamente caracterizadas e a elucidação das mesmas será discutida na secção 5.

As técnicas de RMN usadas para a elucidação destas estruturas foram ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, DEPT 135, DEPT 90, HSQC, HMBC e NOESY, incluindo 1,1-*Adequate*, H2BC e HSQC-TOCSY editado. Obtiveram-se também espectros de IV e HR-MS, anexos vii-8 a vii-15).

3.5.1. PTM-420-F4-F15

Goma alaranjada (8,81 mg); R_T : 22,2 min.; **UV máx. (nm)**: 190,6, 248,9, 354,7; **^1H RMN (600 MHz, CDCl_3)**: δ 5,35 (d, 2H, $J = 3,3$ Hz), 5,26 (ls, 1H), 4,29 (dd, 1H, $J = 11,9, 4,10$ Hz), 4,14 (dd, 1H, $J = 11,9, 5,93$ Hz), 2,31 (m, 3H), 2,02 (m, 3H), 1,60 (m, 4H), 1,28 (m, 27H), 0,87 (t, 5H, $J = 5,26$ Hz); **^{13}C RMN (150,92 MHz, CDCl_3)**: δ 173,31 (qC), 172,89 (qC), 130,01 (CH), 129,69 (CH), 68,88 (CH), 62,10 (CH_2), 34,19 (CH_2), 34,02 (CH_2), 31,89 (CH_2), 31,51 (CH_2), 29,75 (CH_2), 29,67 (CH_2), 29,64 (CH_2), 29,61 (CH_2), 29,50 (CH_2), 29,30 (CH_2), 29,16 (CH_2), 29,10 (CH_2), 29,07 (CH_2), 29,03 (CH_2), 27,21 (CH_2), 27,16 (CH_2), 25,61 (CH_2), 24,82 (CH_2), 22,67 (CH_2), 22,56 (CH_2), 14,09 (CH_3); **IV NaCl ν_{max} (cm^{-1})**: 3392,90, 2927,68, 2856,08, 1743,27, 1620,23, 1457,51, 1261,73, 1167,74; **HR-MS m/z** 513,14, $[\text{M}-\text{H}]^-$; $[\alpha]_D^{32}$ 0 ($c = 0,355\text{g}/100\text{mL}$, CHCl_3).

3.5.2. PTM-420-F5-F31

Goma alaranjada (1,78 mg); R_T : 68,1 min.; **UV máx. (nm)**: 190,6, 251,6; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)**: δ 5,35 (m, 2H), 5,26 (t, 1H, $J = 12,1$ Hz), 4,29 (dd, 1H, $J = 11,8, 4,2$ Hz), 4,14 (m, 1H), 2,31 (td, 3H, $J = 16,2, 3,7$ Hz), 2,02 (m, 4H), 1,61 (m, 4H), 1,28 (m, 24H), 0,88 (t, 4H, $J = 6,7$ Hz); **^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3)**: δ 173,28 (qC), 144,70 (qC), 130,01 (CH), 129,70 (CH), 68,87 (CH), 62,09 (CH_2), 34,18 (CH_2), 34,02 (CH_2), 31,89 (CH_2), 29,76 (CH_2), 29,69 (CH_2), 29,52 (CH_2), 29,32 (CH_2), 29,19 (CH_2), 29,17 (CH_2), 29,12 (CH_2), 29,08 (CH_2), 29,04 (CH_2), 27,21 (CH_2), 27,16 (CH_2), 24,87 (CH_2), 24,83 (CH_2), 22,67 (CH_2), 14,10 (CH_3); **IV NaCl ν_{max} (cm^{-1})**:

3473,99, 2926,90, 2855,66, 1745,03, 1464,99, 1166,24, 772,22, 723,34; **HR-MS m/z** 459,2028, [M-H]⁻.

3.5.3. PTM-420-F5-F38

Goma alaranjada (1,72 mg); **R_T**: 82,9 min.; **UV máx. (nm)**: 190,4, 260,0; **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)**: δ 5,35 (m, 2H), 5,26 (t, 1H, J= 8 Hz), 4,29 (dd, 1H, J= 11,9, 4,2 Hz), 4,14 (dd, 1H, J= 11,9, 5,9 Hz), 2,31 (t, 3H, J= 7,4 Hz), 2,02 (m, 3H), 1,61 (m, 4H), 1,27 (m, 21H), 0,88 (t, 4H, J= 12 Hz); **IV NaCl ν_{\max} (cm⁻¹)**: 3465,80, 2927,16, 2855,75, 1743,64, 1620,70, 1260,78, 1168,68, 772,47; **HR-MS m/z** 459,1580, [M-H]⁻.

Nota: Os desvios de ¹³C não foram aqui descritos devido à sua baixa intensidade.

3.5.4. PTM-420-F5-F42

Goma alaranjada (2,19 mg); **R_T**: 91,2 min.; **UV máx. (nm)**: 190,0, 282,9; **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)**: δ 5,35 (m, 2H), 5,26 (t, 1H, J= 8 Hz), 4,29 (dd, 1H, J= 11,9, 4,3 Hz), 4,14 (dd, 1H, J= 11,9, 5,9 Hz), 2,30 (t, 3H, J= 10,2 Hz), 2,01 (m, 5H), 1,61 (m, 4H), 1,27 (m, 30H), 0,88 (t, 5H, J= 8,5 Hz); **IV NaCl ν_{\max} (cm⁻¹)**: 3457,09, 2927,26, 2855,92, 1743,54, 1463,92, 1377,82, 1167,56, 723,24; **HR-MS m/z** 439,1752, [M-H]⁻.

Nota: Os desvios de ¹³C não foram aqui descritos devido à sua baixa intensidade.

3.5.5. PTM-420-F5-F43

Goma alaranjada (2,83 mg); **R_T**: 92,5 min.; **UV máx. (nm)**: 190,0, 251,7; **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)**: δ 5,35 (m, 2H), 5,26 (t, 1H, J= 12 Hz), 4,29 (dd, 1H, J= 11,9, 4,3 Hz), 4,14 (dd, 1H, J= 11,9, 5,9 Hz), 2,30 (t, 3H, J= 14,8 Hz), 2,03 (m, 5H), 1,61 (m, 4H), 1,44 (d, 1H, J= 3,6 Hz), 1,26 (m, 22H), 0,88 (t, 4H, J= 12,4 Hz); **¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃)**: δ 173,46 (qC), 173,04 (qC), 130,17 (CH), 129,85 (CH), 69,03 (CH), 62,26 (CH₂), 34,35 (CH₂), 34,18 (CH₂), 31,95 (CH₂), 29,75 (CH₂), 29,70 (CH₂), 29,52 (CH₂), 29,32 (CH₂), 29,16 (CH₂), 29,11 (CH₂), 27,21 (CH₂), 27,17 (CH₂), 24,84 (CH₂), 22,66 (CH₂), 22,57 (CH₂), 14,10 (CH₃); **IV NaCl ν_{\max} (cm⁻¹)**: 3420,33, 2926,92, 2855,64, 1744,57, 1620,74, 1459,03, 1378,23, 1263,64, 1168,94; **HR-MS m/z** 441,1921, [M-H]⁻.

3.5.6. PTM-420-F5-F44

Goma alaranjada (3,62 mg); R_T : 94,6 min.; **UV máx. (nm)**: 190,0, 250,6; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)**: δ 12,55 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz), 11,92 (s, 1H), 7,20 (s, 1H), 7,14 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz), 6,90 (s, 1H), 6,71 (d, 1H, $J = 17,2$ Hz), 5,34 (m, 2H), 5,26 (t, 1H, $J = 8$ Hz), 4,94 (s, 1H), 4,90 (s, 1H), 4,84 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz), 4,79 (t, 1H, $J = 11,9$ Hz), 4,43 (m, 1H), 4,29 (dd, 1H, $J = 11,8, 4,3$ Hz), 4,15 (dd, 1H, $J = 12,0, 5,9$ Hz), 2,44 (m, 3H), 2,31 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz), 2,02 (m, 5H), 1,72 (s, 3H), 1,66 (s, 2H), 1,61 (m, 5H), 1,53 (s, 2H), 1,49 (s, 3H), 1,43 (d, 2H, $J = 4,6$ Hz), 1,27 (m, 30H), 1,07 (m, 3H), 0,87 (t, 5H, $J = 5,4$ Hz); **IV NaCl ν_{max} (cm^{-1})**: 3347,49, 2927,92, 1743,18, 1618,25, 1456,18, 1371,77, 1264,47, 1172,06, 1076,26, 867,98, 760,21; **HR-MS m/z** 495,1346, $[\text{M-H}]^-$.

Nota: Os desvios de ^{13}C não foram aqui descritos devido à sua baixa intensidade.

3.5.7. PTM-420-F5-F45

Goma alaranjada (3,54 mg); R_T : 96,7 min.; **UV máx. (nm)**: 190,0, 252,0; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)**: δ 7,35 (s, 1H), 6,73 (s, 1H), 5,34 (m, 2H), 5,26 (t, 1H, $J = 11,8$ Hz), 5,01 (m, 1H), 4,86 (s, 1H), 4,77 (t, 1H, $J = 11,9$ Hz), 4,45 (m, 1H), 4,29 (dd, 1H, $J = 11,9, 4,3$ Hz), 4,14 (dd, 1H, $J = 12,0, 5,9$ Hz), 2,84 (m, 1H), 2,48 (m, 3H), 2,31 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz), 2,01 (m, 4H), 1,83 (t, 1H, $J = 15,9$ Hz), 1,73 (d, 2H, $J = 11,9$ Hz), 1,61 (m, 4H), 1,54 (s, 2H), 1,50 (s, 2H), 1,39 (d, 3H, $J = 16$ Hz), 1,26 (m, 23H), 1,19 (s, 3H), 1,09 (s, 2H), 0,87 (t, 5H, $J = 5,4$ Hz); **IV NaCl ν_{max} (cm^{-1})**: 3480, 2927,95, 2856,12, 1743,00, 1719,21, 1619,44, 1456,06, 1371,85, 1263,88, 1171,52, 887,82, 772,25; **HR-MS m/z** 495,1348, $[\text{M-H}]^-$.

Nota: Os desvios de ^{13}C não foram aqui descritos devido à sua baixa intensidade.

3.5.8. PTM-420-F5-F47

Goma alaranjada (1,88 mg); R_T : 99,2 min.; **UV máx. (nm)**: 190,0, 255,9; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)**: δ 5,35 (m, 3H), 3,66 (s, 3H), 2,31 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz), 2,02 (m, 6H), 1,62 (m, 5H), 1,27 (m, 30H), 0,88 (t, 5H, $J = 5,4$ Hz); **HR-MS m/z** 477,1685, $[\text{M-H}]^-$.

Nota: Os desvios de ^{13}C não foram aqui descritos devido à sua baixa intensidade.

4. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE ISOPRENÓIDES HÍBRIDOS: NAPIRADIOMICINAS

4.1. PTM-420-F2+F3-F20

Apesar de não ter demonstrado uma atividade antimicrobiana significativa contra MRSA e VRE, o composto PTM-420-F2+F3-F20 revelou uma importante atividade contra os biofilmes marinhos, apresentando uma inibição máxima de 67,7% para uma concentração de 3,90 µg/ mL.

Ainda numa fase prévia da elucidação estrutural, a análise do perfil UV e os máximos de absorção do composto permitem determinar que se trata de um composto da família napiradiomicina de acordo com o seu perfil UV característico, o que foi confirmado através de espectroscopia 1D e 2D de RMN e espectrometria de massa HR-ESI-MS. A estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F20 encontra-se ilustrada na figura iii-1 e a sua elucidação retratada na tabela iii-14.

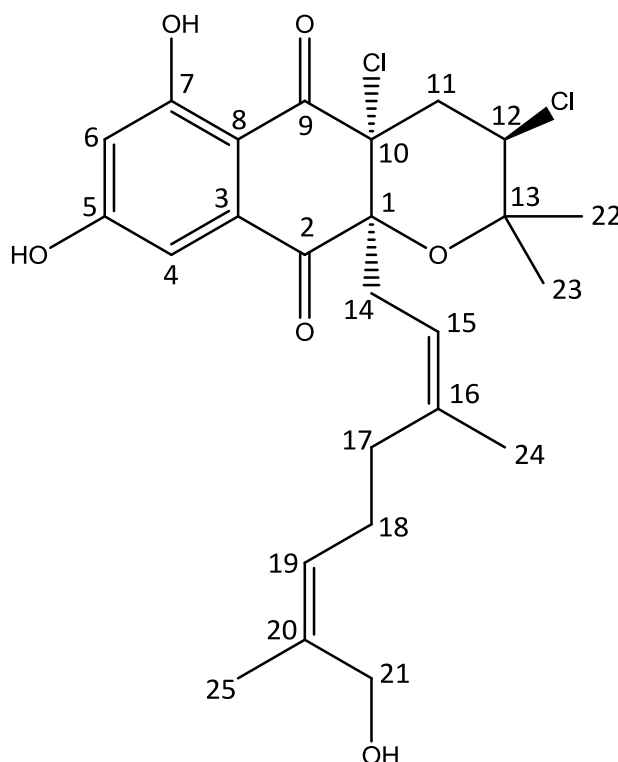


Figura iii-1 – Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F20

Tabela iii-14 – Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F20

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
1	84,46, qC	-	-	-	-	-
2	194,68, qC	-	-	-	-	-
3	134,80, qC	-	-	-	-	-
4	108,20, CH	7,13, s	H-6	C-6	H-6	-
5	165,28, qC	-	-	-	-	-
6	109,47, CH	6,71, d, (5,3)	H-4	C-7	H-4	-
7	165,28, qC	-	-	-	-	-
8	108,87, qC	-	-	-	-	-
9	193,72, qC	-	-	-	-	-
10	79,07, qC	-	-	-	-	-
11a	42,41, CH ₂	2,41, m;	H-12	-	H-12	-
11b		2,52, m				H-12
12	58,74, CH	4,47, m	H-11	-	H-11	H-11b, H-23
13	78,86, qC	-	-	-	-	-
14a	40,48, CH ₂	2,52, m;	H-15	C-1	H-15	H-14b
14b		2,73, dd, (14,3; 6,5)				H-14a
15	116,87, CH	4,90, t, (7,7)	H-14	-	H-14, H-24	H-14b, H-21a
16	139,70, qC	-	-	-	-	-
17	38,67, CH ₂	1,89, m	H-18	C-18	H-18, H-19, H-24	
18	24,81, CH ₂	1,89, m	H-19	-	H-17, H-19	
19	126,69, CH	5,28, m	H-18	-	H-17, H-18, H-21, H-25	H-21a

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
20	133,69, qC	-	-	-	-	-
21a	69,10, CH ₂	4,19, d, 12,9	-	-	H-19, H-25	H-19
21b		4,09, d, 12,5				-
22	22,22, CH ₃	1,23, s	-	C-12, C-13, C-23	H-23	H-11a
23	29,08, CH ₃	1,50, s	-	C-12, C-13, C-22	H-22	H-12
24	15,73, CH ₃	1,23, s	-	C-15, C-16, C-17	H-15	-
25	13,78, CH ₃	1,64, s	-	C-19, C-20, C-21	H-19, H-21	-
7-OH	-	11,98, s	-	-	-	-

O composto PTM-420-F2+F3-F20 mostrou ter o perfil de absorção UV consistente com os derivados da família napiradiomicina¹⁰, apresentando máximos de UV a 197,7, 252,4 e 361,3 nm (anexo vii-3).

Os resultados da espectrometria de massa HR-ESI-MS do composto revelaram claramente a presença de dois átomos de cloro de acordo com as abundâncias relativas dos dois isótopos de cloro, ³⁵Cl e ³⁷Cl, (espectro no anexo vii-3) e sugeriram que a fórmula molecular do composto era C₂₅H₂₉Cl₂O₆ ([M-H]⁻ *m/z* (obs.) 495,1349).

A análise dos dados espectrais de RMN obtidos e posterior comparação dos mesmos com o composto já descrito, 18-hidroxinapiradiomicina A1¹³, permitiu concluir que se tratava da mesma estrutura.

O espectro ¹H do composto mostra que existem dois prótons aromáticos: H-4 (δ ¹H 7,13, s) e H-6 (δ ¹H 6,71, d); quatro grupos metilo quaternários alifáticos: H-22 e H-24 (δ ¹H 1,23, s), H-23 (δ ¹H 1,50, s) e H-25 (δ ¹H 1,64, s); um próton adjacente a uma ligação C-Cl: H-12 (δ ¹H 4,47, m), característica do anel de tetrahidropirano substituído dos compostos napiradiomicina; e a existência de um desvio químico a campo baixo, 7-OH (δ ¹H 11,98, s), característico destes compostos e que se deve há formação de uma ponte de hidrogénio entre o hidrogénio do grupo hidroxilo e o grupo carbonilo na posição C-9.

Desta forma o anel de dihidroxi-dihidronaftoquinona foi identificado pelos seguintes desvios e correlações:

- Pelo espectro de ^{13}C verificou-se a presença de dois carbonilos: C-2 ($\delta^{13}\text{C}$ 194,68, qC) e C-9 ($\delta^{13}\text{C}$ 193,72, qC) e de dois carbonos fenólicos cujo desvio químico é o mesmo devido à maior intensidade do sinal (aproximadamente o dobro da intensidade dos outros carbonos quaternários): C-5 e C-7 ($\delta^{13}\text{C}$ 165,28, qC). A posição de C-7 e C-9 foi atribuída inequivocamente tendo em conta a formação de ponte de hidrogénio entre o hidrogénio do grupo 7-OH e o oxigénio do grupo carbonilo em C-9, o que origina um anel de seis membros estável. O facto de H-4 ser um singleto e não ter vizinhança ajudou a determinar a posição relativa de C-5 e C-6 ($\delta^{13}\text{C}$ 109,47, CH).
- H-11 ($\delta^1\text{H}$ 2,41, m; 2,52, m) e H-12 apenas se correlacionam entre si no COSY, indicando que C-10 ($\delta^{13}\text{C}$ 79,07, qC) e C-13 ($\delta^{13}\text{C}$ 78,86, qC) seriam quaternários. A identificação inequívoca de C-13 e C-10 teve como base a correlação com os protões correspondentes aos grupos metilos (H-22 e H-23) ligados ao C-13.
- A posição dos metilos H-22 e H-23 é dada pela correlação dos mesmos com C-12 ($\delta^{13}\text{C}$ 58,74, CH) e C-13 por HMBC.
- Pelo espectro de ^{13}C verificou-se também que C-10 tem desvio característico de uma ligação a um halogénio, o que é comum nesta posição nos derivados de napiradiomicina.
- C-1 ($\delta^{13}\text{C}$ 84,46, qC) apresenta um desvio característico de ligação C-O, coincidindo com o composto publicado na literatura.¹³ Verificou-se que é nesta posição que ocorre a ligação com a unidade de terpeno pela correlação por HMBC de H-14 ($\delta^1\text{H}$ 2,52, m; 2,73, dd) e C-1.

A atribuição da unidade terpeno foi efetuada através dos seguintes desvios e correlações:

- Pelo HSQC e DEPT 90 verificou-se a presença de dois CH com hibridação sp^2 , H-15 ($\delta^1\text{H}$ 4,90, t) e H-19 ($\delta^1\text{H}$ 5,28, m). Estes protões apenas correlacionam por COSY com protões CH_2 alifáticos o que permitiu concluir que a estrutura é constituída por duas unidades de isopreno.
- H-24 e H-25 são os protões dos grupos metilos e correlacionam por TOCSY com H-15 e H-19, respetivamente.
- Por COSY identificaram-se as posições de H-17 ($\delta^1\text{H}$ 1,89, m), H-18 ($\delta^1\text{H}$ 1,89, m) e H-19. Os dados de HMBC correlacionam H-25 do grupo metilo com C-19 ($\delta^{13}\text{C}$ 126,69, CH), C-20 ($\delta^{13}\text{C}$ 133,69, qC) e C-21 ($\delta^{13}\text{C}$ 69,10, CH_2); e H-24 com C-15 ($\delta^{13}\text{C}$ 116,87, CH), C-16 ($\delta^{13}\text{C}$ 139,70, qC) e C-17 ($\delta^{13}\text{C}$ 38,67, CH_2).
- Os dois protões do grupo CH_2 H-21 ($\delta^1\text{H}$ 4.19, d; 4.09, d) não correlaciona com mais nenhum protão no COSY indicando que é um CH_2 terminal precedido por um carbono quaternário, C-20. Os dados de TOCSY confirmam a correlação de H-21 com H-19.

Relativamente ao espectro de IV do composto é possível confirmar a presença de grupos funcionais, como o grupo -OH (3100 cm^{-1}), os carbonilos C=O ($1615,34\text{ cm}^{-1}$), as ligações C-Cl ($757,79\text{ cm}^{-1}$) e as ligações C-OH aromáticas ($1259,18\text{ cm}^{-1}$).

Pelos dados de NOESY verificaram-se correlações entre os prótons H-12 com H-11b e H-23, e de H-21 com H-19, indicando que estes prótons se encontram no mesmo lado do plano. Obteve-se $[\alpha]^{32}_{\text{D}} = -39^\circ$ sendo o valor referenciado na literatura de $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -33^\circ$ o que confirma a identidade da estrutura. Contudo a divergência entre os valores está associada à diferença de temperatura das duas análises, às concentrações das amostras e a pureza das mesmas.

4.2. PTM-420-F2+F3-F35

O composto PTM-420-F2+F3-F35 apresentou uma concentração mínima inibitória de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ e 31,21 $\mu\text{g/mL}$ contra MRSA e VRE, respetivamente. Apresentou ainda uma percentagem de inibição de biofilmes de 70,9% com um MIC de 0,99 $\mu\text{g/mL}$, para a estirpe *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Pela análise dos perfis UV e os seus máximos (200,5, 251,1, 360,4 nm), anexo vii-4, verificou-se que o composto pertencia à família napiradiomicina. A estrutura foi elucidada através de técnicas 1D e 2D de RMN e confirmada por espectrometria de massa HR-ESI-MS.

O perfil do ião molecular indicado no espectro de massa sugere a presença de dois átomos de cloro, de acordo com as abundâncias relativas dos dois isótopos, ^{35}Cl e ^{37}Cl . Os resultados indicam que a fórmula molecular dos compostos era $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{O}_5$ ($[\text{M-H}]^-$ m/z (obs.) = 479,1400).

A análise da espectroscopia 1D e 2D de RMN permitiu concluir que a estrutura elucidada já foi reportada anteriormente, sendo conhecida como napiradiomicina A1¹⁶. A estrutura encontra-se representada na figura iii-2 e os dados da sua elucidação estrutural foram descritos na tabela iii-15. Os espectros referentes encontram-se nos anexos vii-4.

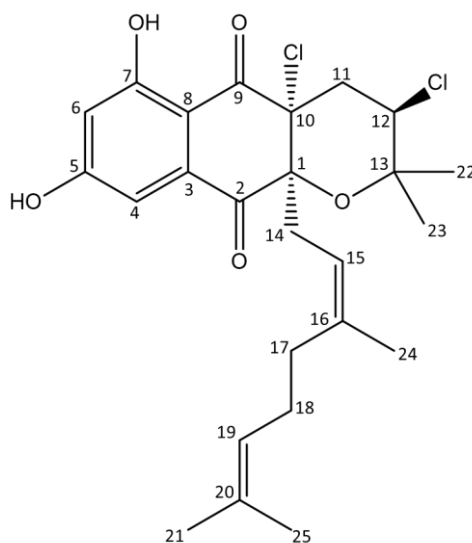


Figura iii-2 – Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F35

Tabela iii-15 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F35

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
1	83,51, qC	-	-	-	-	-
2	196,27, qC	-	-	-	-	-
3	135,16, qC	-	-	-	-	-
4	107,77, CH	7,22, d, (1,8)	H-6	C-2, C-5, C-6, C-8	H-6	-
5	164,73, qC	-	-	-	-	-
6	109,57, CH	6,74, d, (1,7)	H-4	C-4, C-5, C-7, C-8	H-4	-
7	167,68, qC	-	-	-	-	-
8	110,20, qC	-	-	-	-	-
9	193,78, qC	-	-	-	-	-
10	78,78, qC	-	-	-	-	-
11	42,68, CH ₂	2,46, m	H-12	C-12, C-13	H-12	H-12, H-23
12	58,74, CH	4,42, dd, (11,5; 4,5)	H-11	C-10	H11	H-11, H- 22, H-23
13	78,93, qC	-	-	-	-	-
14	41,29, CH ₂	2,70, d, (8,2)	H-15	C-1, C-2, C-10, C-15, C-16	H-15	H-15
15	114,89, CH	4,71, t, (8,1)	H-14, H-24	-	H-14, H-17, H-24	H-14
16	142,85, qC	-	-	-	-	-
17	39,72, CH ₂	1,62, s	H-18	C-19, C-20, C-24	H-15, H-18, H-19, H-24	-
18	25,91, CH ₂	1,62, s	H-17, H-19	C-19, C-20, C-24	H18, H19	-
19	123,67, CH	4,89, m	H-18	-	H-17, H-18, H-21, H-25	-
20	131,76, qC	-	-	-	-	-

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
21	25,63, CH ₃	1,62, s	-	C-19, C-20, C-25	H-19, H-25	-
22	28,74, CH ₃	1,50, s	-	C-12, C-13, C-23	H-23	-
23	22,24, CH ₃	1,18, s	-	C-12, C-13, C-22	H-22	-
24	16,44, CH ₃	1,31, s	H-15	C-15, C-16, C-17	H-15, H-17	-
25	17,54, CH ₃	1,50, s	-	C-19, C-20, C-21	H-19, H-21	-
7-OH	-	11,84, s	-	C-5, C-6, C-8	-	-

Numa primeira análise dos espectros ^1H e ^{13}C verifica-se a existência de dois prótons aromáticos: H-4 (δ ^1H 7,22, d) e H-6 (δ ^1H 6,74, d), dois grupos fenol: C-5 (δ ^{13}C 164,73, qC) e C-7 (δ ^{13}C 167,68, qC), dois grupos carbonilo: C-2 (δ ^{13}C 196,27, qC) e C-9 (δ ^{13}C 193,78, qC), cinco grupos metilo: C-21 (δ ^{13}C 25,63, CH₃), C-22 (δ ^{13}C 28,74, CH₃), C-23 (δ ^{13}C 22,24, CH₃), C-24 (δ ^{13}C 16,44, CH₃), C-25 (δ ^{13}C 17,54, CH₃), uma ligação H-C-Cl: H-12 (δ ^1H 4,42, dd) bastante característica em compostos napiradiomicina, e a ocorrência de uma ponte de hidrogénio: 7-OH (δ ^1H 11,84, s).

Desta forma o anel de dihidro-dihidroinaftoquinona foi identificado tendo em conta os seguintes desvios e correlações:

- O facto de H-4 e H-6 terem uma constante de acoplamento baixa indica que entre eles está a ligação C-OH (C-5), como é característico na família napiradiomicina.
- A posição de C-9 e 7-OH foi atribuída devido à formação da ponte de hidrogénio, frequente em compostos desta família. A posição relativa destes átomos foi confirmada tendo em conta as seguintes correlações: por HMBC H-4 correlaciona com C-2, C-6 (δ ^{13}C 109,57, CH) e C-8 (δ ^{13}C 110,20, qC), enquanto H-6 correlaciona com C-4 (δ ^{13}C 107,77, CH), C-5, C-7 e C-8 (δ ^{13}C 110,20, qC).
- Por COSY verificou-se que H-12 apenas correlaciona com H-11 (δ ^1H 2,46, m), indicando assim que C-13 (δ ^{13}C 78,93, qC) teria de ser um carbono quaternário. Este facto foi confirmado através das seguintes correlações de HMBC: H-11 correlaciona com C-10 (δ ^{13}C 78,78, qC), C-12 (δ ^{13}C 58,74, CH) e C-13, este último característico de uma ligação C-O.
- C-10 corresponde também a um desvio típico nesta posição, uma ligação C-Cl.

- Os substituintes de C-13 são dois grupos metilo, H-22 (δ ^1H 1,50, s) e H-23 (δ ^1H 1,18, s), cujas suas posições foram confirmadas por TOCSY, onde os dois grupos metilo correlacionam um com outro, e por HMBC, onde H-22 e H-23 correlacionam com C-12 e C-13.
- A ligação à porção isoprenóide é feita através de C-14 (δ ^{13}C 41,29, CH_2). Esta é confirmada através das correlações em HMBC de H-14 (δ ^1H 2,70, m) com C-1, C-2, C-10, C-15 e C-16.
- H-15 (δ ^1H 4,71, t) correlaciona no HSQC com C-15 (δ ^{13}C 114,89, CH), um carbono sp^2 . Pelo COSY H-15 apenas correlaciona com H-14, indicando assim que C-16 (δ ^{13}C 142,85, qC) seria um carbono quaternário sp^2 .
- Um dos substituintes de C-16 é o grupo metilo H-24 que por TOCSY correlaciona com H-15. Desta forma identificou-se uma unidade de isopreno na estrutura.
- H-18 correlaciona no COSY com H-17 (δ ^1H 1,62, s) e com H-19 (δ ^1H 4,89, m). As suas posições foram confirmadas por HMBC onde H-18 correlaciona com C-19 (δ ^{13}C 123,67, CH), C-20 (δ ^{13}C 131,76, qC) e C-24 (δ ^{13}C 16,44, CH_3)
- H-19 apenas correlaciona no COSY com H-18, o que significa que C-20 é um carbono quaternário. Verificou-se que C-20 é substituído por dois grupos metilo, H-21 e H-25, e as suas posições relativas foram confirmadas por HMBC, onde ambos os protões correlacionam com C-19 e C-21, correlacionando também um com o outro no TOCSY.

Para esta estrutura a análise dos dados de NOESY não tem grande interesse visto não haverem carbonos quirais na parte terpenóide do composto. No anel de tetrahidropirano H-12 correlaciona espacialmente com ambos os metilos (H-22 e H-23) indicando que os dois se encontram em rotação, não permitindo identificar em que plano se encontram.

Quanto ao espectro de IV deste composto é possível identificar a presença dos $-\text{OH}$ ($3341,13\text{ cm}^{-1}$), os grupos carbonilo ($1614,99\text{ cm}^{-1}$), ligações C-H de alcanos ($2984,33$ e $2929,27\text{ cm}^{-1}$), as ligações C-Cl ($759,56\text{ cm}^{-1}$) e o grupo $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$ ($1450,10\text{ cm}^{-1}$).

4.3. PTM-420-F2+F3-F22

O composto PTM-420-F2+F3-F22 apresentou uma atividade bastante interessante contra os biofilmes de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, revelando uma inibição máxima do crescimento bacteriano de 84.5% com uma concentração de 3.9 µg/ mL. Como referido anteriormente, após as elucidações dos compostos PTM-420-F2+F3-F22 e PTM-420-F4-F25 verificou-se que se tratava das mesmas estruturas, o que foi confirmado pelas massas exatas e fórmulas propostas.

A análise do perfil UV e dos seus máximos (197,7, 252,4, 361,3 nm), anexos vii-5, sugerem a presença de um composto da família da napiradiomicina, o que foi confirmado pela interpretação dos dados 1D e 2D de RMN e espectrometria de massa HR-ESI-MS.

A estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F22 está ilustrada na figura iii-3 e a sua elucidação retratada na tabela iii-16. Os espectros referentes encontram-se nos anexos vii-5.

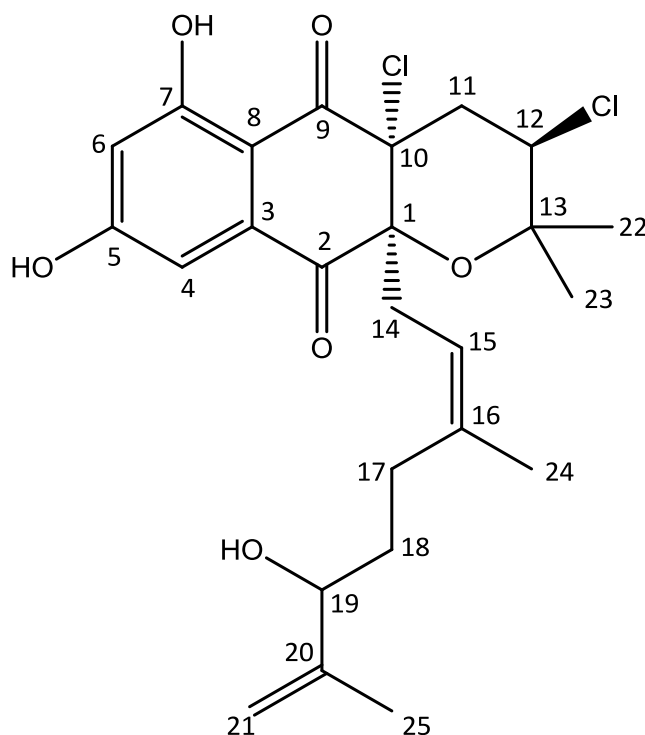


Figura iii-3 – Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F22

Tabela iii-16 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F22

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
1	84,30, qC	-	-	-	-	-
2	196,13, qC	-	-	-	-	-
3	134,77, qC	-	-	-	-	-
4	108,52, CH	7,32, s	H-6	C-5, C-8	H-6	-
5	165,24, qC	-	-	-	-	-
6	110,16, CH	6,75, s	H-4	C-5, C-7, C-9	H-4	-
7	165,24, qC	-	-	-	-	-
8	109,39, qC	-	-	-	-	-
9	193,70, qC	-	-	-	-	-
10	79,10, qC	-	-	-	-	-
11	42,69, CH ₂	2,48, m	H-12, H-14, H-15	C-1, C-2, C-10, C-13	H-12	H-22
12	58,77, CH	4.45, dd, (11,8, 3,8)	H-11	C-13	H-11	H-23
13	79,26, qC	-	-	-	-	-
14a	40,22, CH ₂	2,48, m	H-15	C-1, C-2, C-10, C-13, C-15, C-16	H-15, H-24	H-15
14b		2,81, m				H-15
15	116,52, CH	4,76, t, (7,8)	H-14	H-14, H-17, H-24	H-14, H-24	H-14a, H-14b, H-17, H-24
16	141,54, qC	-	-	-	-	-
17	35,86, CH ₂	1,82, t, (7,4)	H-18	C-15, C-16, C-19	H-18, H-19, H-24	H-15, H-19
18	31,85, CH ₂	1,35, m	H-17, H-19	C-15, C-16, C-19	H-17, H-19	H-15
19	75,39, CH	4,03, t, (6,4)	H-18	C-18, C-20, C-21, C-25	H-17, H-18, H-21	H-17, H-21a

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
20	146,46, qC	-	-	-	-	-
21a	111,97, CH ₂	4,96, s	H-25	C-19, C-20	H-19, H-25	H-19
21b		4,87				H-25
22	22,38, CH ₃	1,19, s	-	C-12, C-13, C-23	H-23	H-11
23	29,05, CH ₃	1,51, s	-	C-12, C-13, C-22	H-22	H-12
24	16,11, CH ₃	1,35, s	-	C-15, C-16	H-17	H-15, H-19
25	17,88, CH ₃	1,71, s	H-21	C-19, C-20, C-21	H-21	H-21b
7-OH	-	11,94, s	-	C-4, C-6, C-7, C-8	-	-

Os resultados da espectrometria de massa indicam a presença de dois Cl e a fórmula molecular proposta foi C₂₅H₂₉Cl₂O₆ ([M-H]⁻ *m/z* (obs.) 495,1346), confirmando os resultados esperados. A análise dos resultados 1D e 2D de RMN e posterior comparação com dados bibliográficos permitiu concluir que a estrutura é uma napiradiomicina A2.¹³

Verificou-se pelo ¹H que existem dois prótons aromáticos: H-4 (δ ¹H 7,32, s) e H-6 (δ ¹H 6,75, s), dois grupos carbonilo: C-2 (δ ¹³C 196,13, qC) e C-9 (δ ¹³C 193,70, qC), dois grupos hidroxilo aromáticos: C-5 e C-7 (δ ¹³C 165,24, qC), quatro grupos metilo ligados a carbonos quaternários: H-22 (1,19, s), H-23 (1,51, s), H-24 (1,35, m) e H-25 (1,71, s), a presença de um CH e um CH₂ de hibridação sp²: C-15 (δ ¹³C 116,52, CH) e C-21 (δ ¹³C 111,97, CH₂), respetivamente; uma ponte de hidrogénio: 7-OH (δ ¹H 11,94, s) e uma ligação HC-Cl: H-12 (δ ¹H 4,45, dd), características em compostos da família napiradiomicina.

A atribuição relativa dos átomos no anel de dihidroxi-dihidronaftoquinona foi feita tendo em conta os seguintes desvios:

- Apesar de só haver um sinal indicativo de um C-OH aromático no espectro de ¹³C, o mesmo tinha o dobro da intensidade dos restantes sinais de carbonos quaternários, indicando assim a presença de dois grupos -OH aromáticos com o mesmo desvio de ¹³C.
- A típica ponte de hidrogénio entre 7-OH e C-9 (confirmada por HMBC) e as multiplicações dos prótons aromáticos (H-4 e H-6) indicam as posições relativas de C-2, C-4 (δ ¹³C 108,52, CH), C-5 e C-7, típicas em compostos napiradiomicina.

- O anel de tetrahidopirano foi confirmado pelo desvio H-12 que pelo COSY correlaciona com os prótons em H-11 (δ ^1H 2,48, m). Existem também dois grupos metilo, C-22 (δ ^{13}C 22,38, CH_3), C-23 (δ ^{13}C 29,05, CH_3), cuja posição relativa foi confirmada pela correlação em HMBC de H-22 e H-23 com C-12 e C-13 (δ ^{13}C 79,26, qC). A posição de C-10 (δ ^{13}C 79,10, qC) indica também uma ligação C-Cl característica, enquanto C-1 (δ ^{13}C 84,30, qC) indica uma ligação C-O. As posições relativas foram confirmadas por HMBC onde H-11 correlaciona com C-1 e C-10.
- A ligação do anel dihidroxi-dihidronaftoquinona à porção terpenóide é feita através de C-14 (δ ^{13}C 40,22, CH_2). Por HMBC H-14 correlaciona com C-1, C-2, C-10 e C-13.
- Por COSY verifica-se que H-15 (δ ^1H 4,76, t) apenas correlaciona com H-14 (δ ^1H 2,48, m; 2,81, m). Desta forma conclui-se que C-16 (δ ^{13}C 141,54, qC) é um carbono quaternário.
- Pelo TOCSY H-15 correlaciona com H-24, um grupo metilo ligado a C-16, indicando assim a presença de uma unidade isopreno. A posição relativa destes átomos foi dada tendo em conta a análise de HMBC onde H-24 correlaciona com C-15 e C-16.
- H-18 (δ ^1H 1,35, m) correlaciona no COSY com H-17 (δ ^1H 1,82, t) (prótons de um CH_2 alifático) e com H-19 (δ ^1H 4,03, t) que tem um desvio característico de uma ligação C-OH alifática. Por HMBC verificou-se que H-17 e H-18 correlacionam com C-15, C-16 e C-19 (δ ^{13}C 75,39, CH), confirmando a posição dos mesmos.
- Pelo COSY verifica-se que H-18 é o único próton vizinho de H-19. Pelo TOCSY H-19 correlaciona com H-17, H-18 e H-21 (δ ^1H 4,96, s; 4,87, s). Desta forma determinou-se a posição do $=\text{CH}_2$ terminal (C-21) e um grupo metilo cujo desvio indica a ligação a um carbono quaternário sp^2 , C-20 (δ ^{13}C 146,46, qC). As posições destes átomos foram confirmadas por HMBC onde: H-25 correlaciona com C-19, C-20 e C-21, e H-21 com C-19 e C-20.

Com o espectro IV do composto é possível confirmar a presença de grupos funcionais, como o grupo -OH (3300 cm^{-1}), os carbonilos $\text{C}=\text{O}$ ($1615,34\text{ cm}^{-1}$), as ligações C-Cl ($757,79\text{ cm}^{-1}$) e os alcanos CH_3 ($1386,13$ e $1371,64\text{ cm}^{-1}$).

O NOESY indica a correlação espacial de H-25 com H-21b e de H-12 com H-23, sugerindo que estão no mesmo plano. Relativamente à estereoquímica em C-19 os resultados de NOESY não revelam informação adequada à atribuição do centro quiral. Apenas se pode retirar que H-19 correlaciona com H-21a, indicando que estes prótons se encontram no mesmo plano. No artigo onde foram descritos os dois diastereoisómeros (A2a e A2b),¹³ a atribuição da estereoquímica em C-19 foi feita recorrendo ao método de Mosher e os valores de rotação ótica específica são de +16 e +9 para A2a (α -OH) e A2b (β -OH), respetivamente. O composto PTM-420-F2+F3-F22 revelou um $[\alpha]_D^{32} = -19$, o que não permite tirar nenhuma conclusão sobre qual dos diastereoisómeros se encontra presente na nossa amostra. Contudo, o valor de rotação ótica específica obtida sendo praticamente simétrica da obtida para o estereoisómero 2a parece bastante curioso. Terão de ser realizados mais estudos de forma a determinar a configuração absoluta deste composto.

4.4. PTM-420-F2+F3-F39

Apesar de revelar atividade antimicrobiana contra MRSA COL e VRE EF82 (62,5 e 31,21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respetivamente), o interesse na elucidação do composto PTM-420-F2+F3-F39 resultou da sua forte atividade contra biofilmes marinhos, apresentando uma inibição máxima de crescimento de 72,4% para uma concentração de 3,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A análise dos espectros 1D e 2D de RMN revelou que haviam dois compostos bastante semelhantes, podendo formar um dímero. Este só poderia ser confirmado por espectrometria de massa exata uma vez que os dados de RMN não davam informação sobre a possível ligação entre as duas estruturas. Como tal, os resultados da espectrometria de massa HR-ESI-MS confirmaram que não ocorreu dimerização pois não surgiu nenhuma fragmentação do ião molecular com a massa correspondente ao dímero esperado. O espectro de massa revelou dois picos intensos a $m/z = 521,0738$ e $m/z = 557,0503$, confirmando assim a presença de duas estruturas, PTM-420-F2+F3-F39A e B, que serão elucidadas separadamente. Pela análise da intensidade dos desvios no espectro de ^{13}C verificou-se que as duas estruturas estão presentes em igual proporção. Um dos primeiros passos para determinar as estruturas foi obter as correlações de HSQC e COSY tendo-se verificado que o próton característico a 4,45 ppm correlacionava por COSY com os desvios de um CH_2 ($\delta^1\text{H}$ 2,32, 2,52) e um CH sp² ($\delta^1\text{H}$ 6,87). Desta forma as integrações foram baseadas no sinal a 6,87 ppm. Um outro fator determinante foi o facto de haverem desvios de ^{13}C semelhantes que correlacionavam no HSQC com os mesmos prótons, permitindo fazer a elucidação em separado das estruturas. Pelo espectro ^{13}C verificou-se a presença de quatro carbonilos, quatro grupos fenólicos com formação de duas pontes de hidrogénio e oito metilos. O perfil de UV com máximos a 196,1, 252,2 e 357,6 nm, característico de uma napiradiomicina, indicava que ambos os compostos pertencem a esta família.

Relativamente ao espectro de IV do composto é possível retirar informação que confirma a presença de grupos funcionais, como o grupo $-\text{OH}$ ($3321,45\text{ cm}^{-1}$), os grupos carbonilo $-\text{C}=\text{O}$ ($1619,64\text{ cm}^{-1}$), as ligações $\text{C}-\text{Cl}$ ($756,03\text{ cm}^{-1}$), as ligações $\text{C}-\text{OH}$ aromáticas ($1260,41\text{ cm}^{-1}$) e $\text{C}=\text{C}$ ($1703,09\text{ cm}^{-1}$). Os espectros referentes encontram-se nos anexos vii-7.

4.4.1. ELUCIDAÇÃO PTM-420-F2+F3-F39A

A estrutura do composto PTM-420-F2+F3-39A está ilustrada na figura iii-4 e a sua elucidação retratada na tabela iii-17.

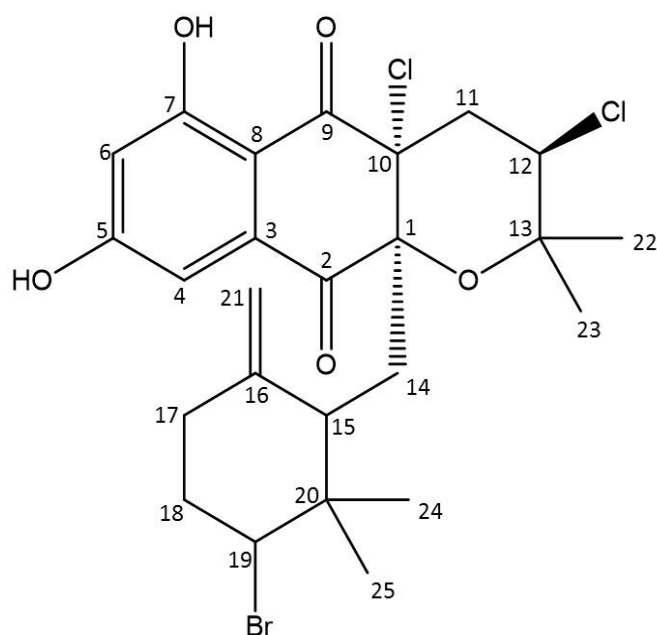


Figura iii-4 - Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F39A

Tabela iii-17 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F39A

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
1	84,36, qC	-	-	-	-	-
2	193,57, qC	-	-	-	-	-
3	135,16, qC	-	-	-	-	-
4	108,64, CH	7,13, d, (5,3)	H-6	C-2, C-8, C-9	H-6	
5	163,83, qC	-	-	-	-	-
6	109,17, CH	6,72, d, (13,1)	H-4	C-4, C-8	H-4	

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
7	165,58, qC	-	-	-	-	-
8	109,58, qC	-	-	-	-	-
9	195,05, qC	-	-	-	-	-
10	81,01, qC	-	-	-	-	-
11a	42,81, CH ₂	2,52, dd, (14; 3,9);	H-11, H-12	-	H-11, H-12	H-11, H-12
11b		2,32, d, (1,9)				H-11, H-23
12	58,87, CH	4,45, dd, (11,0, 2,8)	H-11	C-13	H-11	H-11
13	78,91, qC	-	-	-	-	-
14a	35,47, CH ₂	2,66, m;	H-15	C-10, C-15, C-16	H-15	H-14b, H-21
14b		1,61, d, (16)				H-14a, H-15
15	45,84, CH	2,05, t, (1,6)	H-14	C-16	H-14	H-14b, H-19
16	145,70, qC	-	-	-	-	-
17a	37,44, CH ₂	2,21, m;	H-18	C-16	H-18, H-19	H-18a, H-17b
17b		1,92, m				H-15, H- 17a
18a	36,03, CH ₂	2,21, m	H-17, H-19	C-16	H-17, H-19	H-17b, H-18b
18b		1,92, m				H-18a, H-17a, H-15
19	66,85, CH	4,05, td, (15,3; 8,7)	H-18	-	H-17, H-18	H-15, H-18b
20	41,94, qC	-	-	-	-	-
21	110,35, CH ₂	4,77, d, (6,6)	-	C-15, C-17	-	H-14a
22	29,09, CH ₃	1,37, s	-	C-11, C-13, C-23	H-23	-
23	22,55, CH ₃	1,19, s	-	C-11, C-13, C-22	H-22	H-11b, H-19

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
24	27,92, CH ₃	0,72, s	-	C-15, C-19, C-20, C-25	H-25	-
25	16,45, CH ₃	0,62, s	-	C-15, C-19, C-20, C-24	H-24	-
7-OH	-	12,58, s	-	C-6, C-7	-	-

O perfil do ião molecular $m/z = 557,0503$ sugere claramente a presença de dois átomos de Cl e um de Br no composto. A fórmula molecular proposta é $C_{25}H_{28}BrClO_5$ $[M-H]^+$, confirmando a estrutura proposta com base nos dados de RMN.

- Verificou-se a presença de dois prótons aromáticos (H-4 (δ^1H 7,13, d) e H-6 (δ^1H 6,72, d), dois carbonos fenólicos (C-5 ($\delta^{13}C$ 163,83, qC) e C-7 ($\delta^{13}C$ 165,58, qC) e dois grupos carbonilo (C-2 ($\delta^{13}C$ 193,57, qC) e C-9 ($\delta^{13}C$ 195,05, qC)). As suas posições relativas foram atribuídas tendo em conta a bibliografia de compostos da família napiradiomicina e os dados de HMBC: H-4 correlaciona com C-2, C-8 ($\delta^{13}C$ 109,58, qC) e C-9; H-6 com C-4 ($\delta^{13}C$ 108,64, CH) e C-8, originando o anel de dihidroxi-dihidronaftoquinona.

- Pelo espectro de 1H verificou-se um desvio a 12,04 (δ^1H s, 7-OH) indicativo da formação da ponte de hidrogénio. Por HMBC o grupo 7-OH correlaciona com C-6 ($\delta^{13}C$ 109,17, CH) e C-7.

- H-12 (δ^1H 4,45, dd) apenas correlaciona com H-11 (δ^1H 2,52, dd; 2,32, d) no COSY, indicando assim que C-13 ($\delta^{13}C$ 78,91, qC) seria um carbono quaternário substituído por dois grupos metilos, como é característico nas napiradiomicinas. Esta hipótese foi validada pela correlação em HMBC dos metilos C-22 ($\delta^{13}C$ 29,09, CH₃) e C-23 ($\delta^{13}C$ 22,55, CH₃) com C-11 ($\delta^{13}C$ 42,81, CH₂) e C-12 ($\delta^{13}C$ 58,87, CH), e da correlação em TOCSY entre H-22 (δ^1H 1,37, s) e H-23 (δ^1H 1,19, s).

- A ligação do anel de naftoquinona à porção de terpeno é feita através de C-14 ($\delta^{13}C$ 35,47, CH₂). A posição relativa deste átomo foi confirmada pelas correlações em COSY e TOCSY de H-14 (δ^1H 2,66, m; 1,61, d) com H-15 (δ^1H 2,05, t), e de HMBC entre H-14, C-10 ($\delta^{13}C$ 81,01, qC), C-15 ($\delta^{13}C$ 45,84, CH) e C-16 ($\delta^{13}C$ 145,70, qC).

- O DEPT 90 sugeria a presença de um =CH₂, C-21 ($\delta^{13}C$ 110,35, CH₂), cuja posição relativa foi confirmada por HMBC onde H-21 (δ^1H 4,77, t) correlacionava com C-15 ($\delta^{13}C$ 45,84, CH) e C-17 ($\delta^{13}C$ 37,44, CH₂).

- O COSY indica que H-17 (δ^1H 2,21, m; 1,92, m) tem apenas os prótons de H-18 (δ^1H 2,21, m; 1,92, m) como vizinhos, confirmando a multiplicidade e posição de C-16.

- C-19 (δ ^{13}C 66,85, CH) e H-19 (δ ^1H 4,05, td) têm desvios característicos da presença de um halogênio (Br, confirmado pela massa). A posição deste átomo na estrutura foi confirmada por COSY uma vez que H-19 apenas correlaciona com H-18.

- Por HMBC verificou-se que haviam dois grupos metilos, H-24 (δ ^1H 0,72, s) e H-25 (δ ^1H 0,62, s), que correlacionam um com o outro por TOCSY, e com C-15, C-19 e C-20 por HMBC, confirmando desta forma a presença de um anel de ciclohexano.

A estereoquímica relativa do composto foi atribuída tendo em conta os dados 2D NOESY e a bibliografia para a estrutura Napiradiomicina B3: verificou-se que H-11 correlaciona por NOESY com H-23, assim como H-19 correlaciona com H-18b e H-24, indicando que estes prótons se encontram do mesmo lado do plano. Desta forma, tendo em conta a grande semelhança dos desvios de ^1H e ^{13}C da bibliografia concluiu-se que H-15 e H-19 encontram-se no mesmo plano.

4.4.2. ELUCIDAÇÃO PTM-420-F2+F3-F39B

A estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F39B está ilustrada na figura iii-5 e a sua elucidação retratada na tabela iii-18.

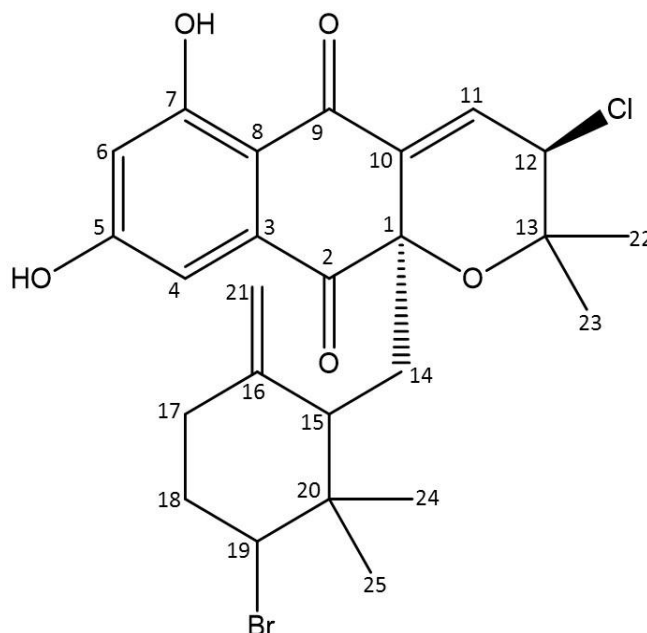


Figura iii-5 – Estrutura do composto PTM-420-F2+F3-F39B

Tabela iii-18 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F2+F3-F39B

Posição	δ_c (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
1	82,39, qC	-	-	-	-	-
2	194,06, qC	-	-	-	-	-
3	135,79, qC	-	-	-	-	-
4	108,49, CH	7,13, d, (5,3)	H-6	C-2, C-8	H-6	
5	164,36, qC	-	-	-	-	-
6	109,17, CH	6,72, d, (13,1)	H-4	C-4	H-4	
7	165,83, qC	-	-	-	-	-
8	111,64, qC	-	-	-	-	-
9	188,52, qC	-	-	-	-	-
10	136,90, qC	-	-	-	-	-
11	137,02, CH	6,87, d, (1,6)	H-11, H-12	C-1, C-9	H-11, H-12	H-12
12	59,56, CH	4,45, dd, (11,0, 2,8)	H-11	C-10, C-11, C-13	H-11	H-11, H-22
13	76,66, qC	-	-	-	-	-
14a	36,03, CH ₂	2,05, m;	H-15	C-10, C-15, C-16	H-15	-
14b		2,21, m				H-15
15	48,07, CH	1,92, m	H-14	C-1, C-16	H-14	H-14b, H-19
16	145,34, qC	-	-	-	-	-
17a	37,61, CH ₂	2,21, m;	H-18	C-16	H-18, H-19	H-17b, H-18a
17b		1,92, m				H-17a, H-18b
18a	35,99, CH ₂	1,92, m;	H-17, H-19	C-16	H-17, H-19	H-18b, H-17a

Posição	δ_C (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	HMBC	TOCSY	NOESY
18b		2,21, m				H-17b, H-18a
19	66,43, CH	4,05, td, (15,3; 8,7)	H-18	-	H-17, H-18	H-15, H-18a
20	42,18, qC	-	-	-	-	-
21a	109,54, CH ₂	4,82, s;	-	C-15, C-17	-	H-21b
21b		4,30, s				H-21a
22	27,25, CH ₃	1,53, s	-	C-12, C-13, C-23	H-23	H-12, H-23
23	20,38, CH ₃	1,08, s	-	C-12, C-13, C-22	H-22	H-22
24	16,60, CH ₃	0,66, s	-	C-15, C-19, C-20, C-25	H-25	H-15
25	28,45, CH ₃	1,08, s	-	C-15, C-19, C-20, C-24	H-24	H-15
7-OH	-	12,58, s	-	C-7, C-8	-	-

O perfil do ião molecular $m/z = 521.0738$ indica a presença de um átomo de Cl e outro átomo de Br. A fórmula molecular proposta é $C_{25}H_{28}BrClO_5 [M-H]^+$, indo de encontro à estrutura prevista (napiradiomicina 5).⁴³

- Verificou-se a presença de dois prótons aromáticos com os mesmos desvios da estrutura A. No entanto, por HSQC verificou-se que estes prótons aromáticos eram atribuídos a diferentes carbonos: C-4 ($\delta^{13}C$ 108,49, CH) e C-6 ($\delta^{13}C$ 109,17, CH). Existem também dois grupos carbonilo, C-2 ($\delta^{13}C$ 194,06, qC) e C-9 ($\delta^{13}C$ 188,52, qC), e dois -OH aromáticos, C-5 ($\delta^{13}C$ 164,36, qC) e C-7 ($\delta^{13}C$ 165,83, qC). Verificou-se também a formação de outra ponte de hidrogénio, 7-OH (δ^1H 12,58, s), que por HMBC correlaciona com C-7 ($\delta^{13}C$ 165,83, qC) e C-8 ($\delta^{13}C$ 111,64, qC).

- A única diferença estrutural entre A e B é a dupla ligação em C-10 ($\delta^{13}C$ 136,90, qC) e C-11 ($\delta^{13}C$ 137,02, CH). Esta foi confirmada pela correlação em COSY de H-11 (δ^1H 6,87, d) com H-12 (δ^1H 4,45, dd), sendo este um próton característico em estruturas napiradiomicina.

- Apesar de os desvios de 1H e ^{13}C serem ligeiramente da estrutura A, não se verificou mais nenhuma diferença a nível estrutural entre os compostos.

- H-12 correlaciona por HMBC com C-10, C-11 e C-13 ($\delta^{13}\text{C}$ 76,66, qC), confirmando também a posição relativa da dupla ligação na estrutura.
- A ligação à unidade terpeno é feita por C-14 ($\delta^{13}\text{C}$ 36,03, CH_2) o que coincide com o desvio apresentado na literatura.
- H-15 ($\delta^1\text{H}$ 1,92, m) correlaciona por COSY com H-14 ($\delta^1\text{H}$ 2,05, m; 2,21, m) e a sua posição relativa é confirmada por HMBC, uma vez que correlaciona com C-1 ($\delta^{13}\text{C}$ 82,39, qC) e C-16 ($\delta^{13}\text{C}$ 145,34, qC).
- Pelo DEPT 90 verificou-se novamente a existência de um $=\text{CH}_2$, C-21 ($\delta^{13}\text{C}$ 109,54, CH_2), correlacionando em HMBC com C-15 ($\delta^{13}\text{C}$ 48,07, CH) e C-17 ($\delta^{13}\text{C}$ 37,61, CH_2).
- H-18 ($\delta^1\text{H}$ 1,92, m; 2,21, m) correlaciona no COSY com H-17 ($\delta^1\text{H}$ 1,92, m; 2,21, m) e H-19 ($\delta^1\text{H}$ 4,05, td), que apresentam o mesmo desvio da estrutura A, indicando também a presença de um Br.
- Verificou-se também a presença de dois grupos metilo, H-24 ($\delta^1\text{H}$ 0,66, s) e H-25 ($\delta^1\text{H}$ 1,08, s), que por HMBC correlacionam entre si e com C-15, C-19 ($\delta^{13}\text{C}$ 66,43, CH) e C-20 ($\delta^{13}\text{C}$ 42,18, qC).

Desta forma, tal como os resultados da espectrometria de massa HR-ESI-MS, os dados de RMN indicam que o composto elucidado é a napiradiomicina 5.⁴³

A estereoquímica relativa do composto foi atribuída tendo em conta os dados 2D NOESY e a bibliografia para a estrutura napiradiomicina 5: verificou-se que H-12 correlaciona com H-11 e com H-23, e H-15 correlaciona com H-19, indicando que estes prótons se situam no mesmo plano da estrutura.

5. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE MACRÓLIDOS

5.1. COMPOSTO PTM-420-F4-F15

Os compostos PTM-420-F4-F15, PTM-420-F5-F31, PTM-420-F5-F38, PTM-420-F5-F42, PTM-420-F5-F43, PTM-420-F5-F44, PTM-420-F5-F45 e PTM-420-F5-F47 pertencem todos à mesma família, que aparenta ser uma nova classe de macrólidos. Contudo a estrutura destes compostos ainda não está completamente caracterizada, como irá ser discutido mais adiante.

O interesse da elucidação destes compostos provem da sua atividade contra os biofilmes clínicos, apresentando todos eles boas percentagens de inibição com concentrações mínimas inibitórias bastante baixas.

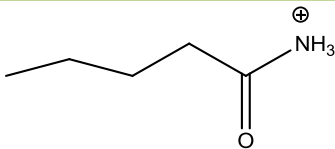
A análise dos perfis de UV e dos dados 1D e 2D de RMN confirmaram que as estruturas pertencem todas à mesma família, anexos vii-8 a vii-15. Inicialmente foram alvo de estudo os dados espectroscópicos dos compostos PTM-420-F5-F42 e PTM-420-F5-F43. No entanto a pouca quantidade de amostra dificulta a identificação de carbonos quaternários no espectro de ^{13}C . Pelo espectro de ^1H verificou-se que os compostos PTM-420-F15, PTM-420-F5-F31, PTM-420-F5-F38, PTM-420-F5-F42, PTM-420-F5-F43, PTM-420-F5-F44 e PTM-420-F5-F45 tinham em comum vários sinais com os seguintes desvios químicos: 3,35 ppm, m; 5,26 ppm, t; 4,29 ppm, dd; 4,14 ppm, dd; 2,31 ppm, t; 2,02 ppm, m; 1,61 ppm, m; 1,27 ppm, m e 0,88 ppm, t. O composto PTM-420-F5-F47 tem apenas em comum com as restantes estruturas alguns sinais com os seguintes desvios químicos: 5,35 ppm, m; 2,31 ppm, t; 2,02 ppm, m; 1,61 ppm, m; 1,27 ppm, m e 0,88 ppm, t.

Apesar de fraco para alguns compostos, a análise do espectro ^{13}C juntamente com o de HMBC revelou também bastantes sinais comuns entre as estruturas com os seguintes desvios químicos: 173,31 (qC), 172,89 (qC), 130,01 (CH), 129,69 (CH), 69,03 (CH), 62,26 (CH₂), 38,18 (CH₂), 34,02 (CH₂), 29,75 – 29,03 (CH₂), 27,21 (CH₂), 27,17 (CH₂), 22,67 (CH₂), 22,56 (CH₂), 14,09 (CH₃) ppm.

O composto F4-F15 é o que apresenta maior quantidade (8,81 mg), consequentemente os espectros 1D e 2D terão maior resolução. Desta forma, a análise da estrutura base dos novos macrólidos irá incidir sobre os dados espectroscópicos do composto PTM-420-F4-F15. A estrutura ainda não está totalmente elucidada, contudo serão aqui apresentadas propostas e subunidades da estrutura, figura iii-6. Inicialmente foram realizadas análises de RMN 1D e 2D num aparelho de 400 MHz. Visto os dados de RMN obtidos serem insuficientes para a elucidação obtiveram-se mais espectros no aparelho de 600 MHz. Os resultados e correlações estão descritos na tabela iii-20.

A espectrometria de massa HR-ESI-MS revelou a existência de dois iões moleculares: $m/z = 411,04$ (com perfil indicativo da presença de dois átomos de Cl) e $m/z = 513,23$ (com perfil indicativo da presença de dois átomos de Cl e um de Br). Os dois iões moleculares apresentam uma abundância relativa semelhante o que dificulta a identificação do ião molecular. Foram também identificados os seguintes fragmentos: $m/z = 71,87$ (indicativo da saída de 2 HCl) e $m/z = 411,13$ (saída de uma amida), tabela iii-19.

Tabela iii-19 – Fragmentações de massa do composto PTM-420-F4-F15

<u>[M-FRAGMENTO]⁺</u>	<u>FRAGMENTO (m/z)</u>	<u>GRUPO IDENTIFICADO</u>
477,28	35,95	HCl
441,36	71,87	2 HCl
411,13	102,01	

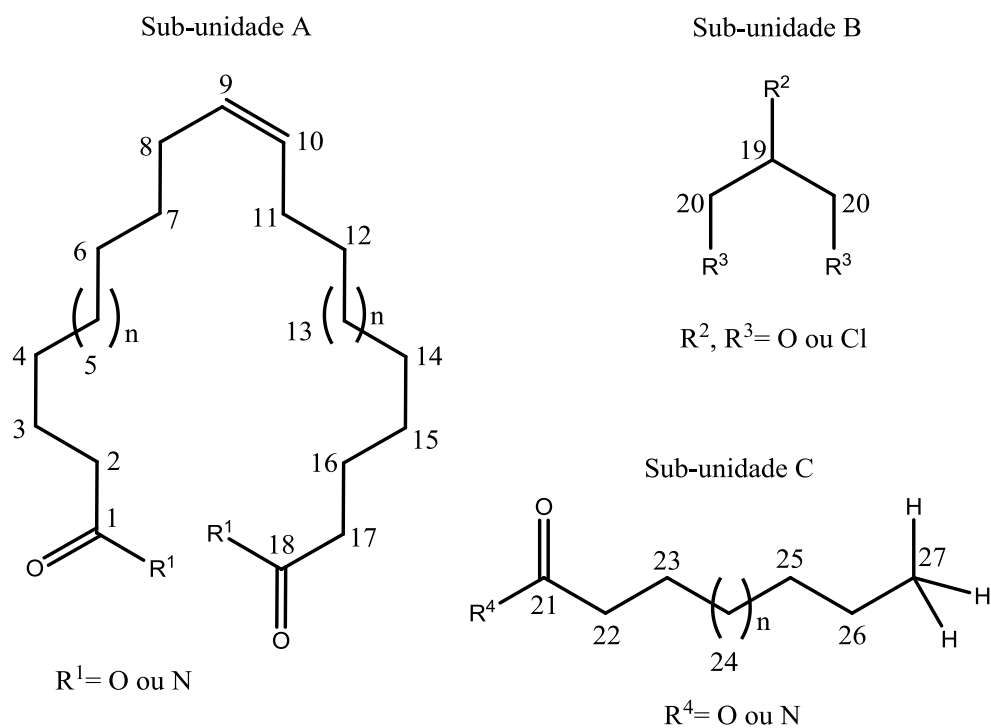


Figura iii-6 – Possíveis subunidades identificados para as estruturas dos macrólidos

Tabela iii-20 - Dados espectroscópicos 1D e 2D do composto PTM-420-F4-F15

Posição	δ_c (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	ADEQUATE	HSQC-TOCSY EDITADO	H2BC	HMBC	NOESY
1	173,31, qC	-	-	-	H2	-	-	-
2	34,18, CH ₂	2,31, m	H-3	C-1, C-3	H-3, H-4	C-3	C-1, C-3, C-4	H-3
3	25,61, CH ₂	1,61, m	H-2, H-4	C-2, C-4	H-2, H-4, H-5	C-2, C-4	C-1, C-2, C-4, C-5	H-2
4	29,75 – 29,03, CH ₂	1,27, m	H-3, H-5	C-3, C-5	H-2, H-3, H-5, H-6	C-3, C-5	C-2, C-3, C-5, C-6	-
5	29,75 – 29,03, CH ₂	1,27, m	H-4, H-6	C-4, C-6	H-3, H-4, H-6, H-7	C-4, C-6	C-3, C-4, C-6, C-7	-
6	29,75 – 29,03, CH ₂	1,27, m	H-5, H-7	C-5, C-7	H-4, H-5, H-7, H-8	C-5, C-7	C-4, C-5, C-7, C-8	-
7	29,75 – 29,03, CH ₂	1,27, m	H-6, H-8	C-6, C-8	H-5, H-6, H-8, H-9	C-6, C-8	C-5, C-6, C-8, C-9	-
8	27,16, CH ₂	2,02, d, (5,5)	H-7, H-9	C-7, C-9	H-6, H-7, H-9	C-7, C-9	C-6, C-7, C-9, C-10	-
9	130,01, CH	5,35, m	H-8	C-8, C-10	H-7, H-8, H-10, H-11	C-8, C-10	C-8	H-8
10	129,69, CH	5,35, m	H-11	C-9, C-11	H-8, H-9, H-11, H-12	C-9, C-11	C-11	H-11
11	27,21, CH ₂	2,02, (2,02)	H-10, H-12	C-10, C-12	H-9, H-10, H-12, H-13	C-10, C-12	C-9, C-10, C-12	-
12	29,75 – 29,03, CH ₂	1,27, m	H-11, H-13	C-11, C-13	H-10, H-11, H-13, H-14	C-11, C-13	C-10, C-13, C-14	-

Posição	δ_c (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	ADEQUATE	HSQC-TOCSY EDITADO	H2BC	HMBC	NOESY
13	29,75 – 29,03, CH ₂	1,27, m	H-12, H-14	C-12, C-14	H-11, H-12, H-14, H-15	C-12, C-14	C-12, C-14, C-15	-
14	29,75 – 29,03, CH ₂	1,27, m	H-13, H-15	C-13, C-15	H-12, H-13, H-15, H-16	C-3, C-15	C-12, C-13, C-15, C-16	-
15	29,75 – 29,03, CH ₂	1,27, m	H-14, H-16	C-14, C-16	H-13, H-14, H-16, H-17	C-14, C-16	C-13, C-14, C-16	-
16	24,82, CH ₂	1,61, m	H-15, H-17	C-15, C-17	H-14, H-15, H-17, H-18	C-15, C-17	C-14, C-15, C-17, C-18	H-17
17	34,18, CH ₂	2,31, (5,5)	H-16	C-16, C-18	H-15, H-16	C-6, C-18	C-15, C-16, C-18	H-16
18	173,31, qC	-	-	-	H-17	-	-	-
19	68,88, CH	5,26, t	H-20	C-20	H-20	C-20	C-20	H-20
20	62,10, CH ₂	4,29, dd, (11,9; 4,10) 4,14, dd, (11,9, 5,93)	H-19	C-19	H-19	C-19	C-1, C-19, C-20, C-21	H-19
21	172,82, qC	-	-	-	H-22	-	-	-
22	34,05, CH ₂	2,31, (5,5)	H-23	C-21, C-23	H-23, H-24	C-23	C-21, C-23, C-24	H-23
23	24,82, CH ₂	1,61, m	H-22, H-24	C-22, C-24	H-22, H-24, H-25	C-22, C-24	C-21, C-22, C-24	H-22

POSIÇÃO	δ_c (ppm), MULT.	δ_H (ppm) (J em Hz)	COSY	ADEQUATE	HSQC-TOCSY EDITADO	H2BC	HMBC	NOESY
24	29,75 – 29,03, CH ₂	1,27, m	H-23, H-24	C-23, C-24	H-22, H-25	C-23, C-24	C-23, C-24	-
25	31,82, CH ₂	1,27, m	H-24, H-26	C-24, C-26	H-24, H-26, H-27	C-26, C-28	C-24, C-26, C-27	-
26	22,67, CH ₂	1,27, m	H-25, H-27	C-25, C-27	H-24, H-25, H-27	C-25, C-27	C-24, C-25, C-27	-
27	14,08, CH ₃	0,87, t, (5,26)	H-26	C-26	H-25, H26	C-26	C-25, C-26	-

- Pela análise do espectro de ^{13}C 600 MHz verifica-se a existência de dois picos referentes a grupos carbonilo, sendo que um deles com o dobro da intensidade, o que leva a crer que a estrutura tem dois grupos carbonilo em ambiente químico semelhante e um terceiro num ambiente diferente. Desta forma foram atribuídos os seguintes carbonos: C-1 e C-18 (δ ^{13}C 173,31, qC) e C-21 (δ ^{13}C 172,89, qC). Todos estes grupos carbonilo correlacionam no 1,1-*Adequate* com H-2, H-17 e H-22 (δ ^1H 2,31 ppm, m). Ainda não foi possível determinar com certeza se se trata de uma amida ou um éster. Caso seja uma amida é possível que a mesma seja uma amida terciária pois no espectro de ^1H não existem desvios referentes a $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$.
- O sinal, a 2,31 ppm (m) correlaciona no HSQC com C-2 (δ ^{13}C 34,18, CH_2) e com C-17 (δ ^{13}C 34,05, CH_2) sendo que este último apresenta o dobro da intensidade. Desta forma atribui-se também C-22 (δ ^{13}C 34,05, CH_2), apesar da hipótese de contaminação não estar excluída.
- Pelo COSY o sinal a 2,31 ppm correlaciona com 1,61 ppm (m), identificando assim H-3, H-16 e H-23, figura iii-6, subunidade A.
- Através do 1,1-*Adequate* verifica-se correlação a duas ligações de C-3 (δ ^{13}C 25,69, CH_2) e C-16 (δ ^{13}C 24,82, CH_2) com H-2 e H-17 (δ ^1H 2,31 ppm, m), e com H-4 e H-15 (δ ^1H 1,27 ppm, m). Desta forma, admite-se também que C-23 correlaciona com H-22 (δ ^1H 2,31 ppm, m) e H-24 (δ ^1H 1,27 ppm, m), figura iii-6, subunidade A.
- Pelo ^{13}C verifica-se a existência de C-9 (δ ^{13}C 130,01, CH) e C-10 (δ ^{13}C 129,69, CH), os dois únicos carbonos sp^2 existentes na estrutura, o que significa que o composto deriva de uma via biossintética distinta uma vez parece não existir porção terpenóide.
- Pelo HSQC C-9 e C-10 correlacionam com o mesmo sinal com desvio químico de ^1H , H-9 e H-10 (δ ^1H 5,35 ppm, m), indicando um ambiente químico semelhante com possível sobreposição dos dois sinais correspondentes aos prótons H-9 e H-10, figura iii-6, subunidade A.
- H-9 e H-10 correlacionam no 1,1-*Adequate* com os carbonos C-8 (δ ^{13}C 27,16, CH_2) e C-11 (δ ^{13}C 27,21, CH_2).
- C-8 e C-11 correlacionam pelo HSQC-TOCSY editado com H-9, H-10, H-12 (δ ^1H 1,27, m) e H-13 (δ ^1H 1,27, m). Por HSQC H-12 e H-13 correlacionam com carbonos na zona 29,73 – 29,03 (CH_2). Desta forma não dá para definir o tamanho da cadeia, supondo-se que C-4, C-5, C-6, C-7, C-12, C-13, C-14 e C-15 sejam todos CH_2 com desvio de ^{13}C entre 29,75 – 29,03 ppm e desvio de ^1H na zona de 1,27 ppm.
- Todos os sinais de carbono têm na sua proximidade um outro sinal com desvio semelhante indicando que a estrutura é cíclica e simétrica. Há também a possibilidade de esses dois sinais semelhantes no espectro de ^{13}C pertencerem ao mesmo carbono (várias conformações), no entanto, isso indica que a estrutura teria menos carbonos CH_2 alifáticos atribuídos, o que não é suportado pelas integrações de ^1H e, sobretudo pelas correlações em HMBC e TOCSY.

- O espectro de ^{13}C indica a presença de apenas um grupo metilo, C-27 ($\delta^{13}\text{C}$ 14,08 ppm, CH_3). O H-27 ($\delta^1\text{H}$ 0,88 ppm, t) correlaciona no 1,1-*Adequate* com o C-26 ($\delta^{13}\text{C}$ 22,67 ppm, CH_2). Pelo HSQC-TOCSY H-27 correlaciona com C-25 ($\delta^{13}\text{C}$ 31,82, CH_2). Este sinal, por sua vez correlaciona no 1,1-*Adequate* com carbonos entre 29,75 – 29,03 ppm (CH_2), onde o HMBC não dá informação sobre o tamanho da cadeia. Visto não ter sido retirada nenhuma informação sobre um carbono quaternário alifático, pensa-se que esta cadeia estará ligada ao grupo carbonilo C-21, figura iii-6, subunidade C.

- Foi medida a rotação ótica específica deste composto, onde $[\alpha]_D^{32} = 0$. Este resultado revela que existe mistura racémica ou então o único carbono assimétrico identificado, C-19 ($\delta^{13}\text{C}$ 68,88, CH) apresenta um plano de simetria. Desta forma é proposto o fragmento B da figura iii-6. H-19 ($\delta^1\text{H}$ 5,26, t) apenas correlaciona por COSY e TOCSY com H-20 ($\delta^1\text{H}$ 4,29, dd; 4,14, dd), verificando-se que a sua integração é cerca de metade de H-20, o que corrobora a proposta da figura iii-6. Os espectros de HMBC e HSQC-TOCSY não revelam mais nenhuma informação acerca da posição relativa destes átomos, no entanto pensa-se que sejam a ligação entre as subunidades A e C, figura iii-6.

Quanto aos dados do espectro de NOESY não é possível retirar nenhuma informação relevante para a elucidação ou a posição relativa de determinados prótons conhecidos no espaço.

Apesar de não ter a estrutura completamente caracterizada é possível retirar algumas informações úteis do espectro de IV:

- O desvio a $1743,27\text{ cm}^{-1}$ é característico da presença de um grupo carbonilo, confirmado pelo RMN.
- $2927,68\text{ cm}^{-1}$ e $2856,08\text{ cm}^{-1}$ são desvios característicos de ligações C-H sp^3 .
- Existe uma banda larga a $3392,90\text{ cm}^{-1}$ que, apesar de pouco intensa é característica de –OH e –NH. No entanto pelo espectro de ^1H não se identifica nenhum sinal relativo a estes grupos funcionais.
- $1261,73$ e $1167,74\text{ cm}^{-1}$ são desvios característicos da ligação C-O de ésteres.
- Quanto à presença de halogénios não é possível retirar informação com clareza acerca da presença de cloros ou bromos.

Algumas propostas serão apresentadas na figura iii-7. As propostas tentam respeitar os desvios de RMN identificados, ir de encontro aos fragmentos de ião molecular propostos, $m/z = 513,23$ e $m/z = 411,04$ e conter dois átomos de Cl cuja fragmentação é visível. Tendo em conta os dados obtidos até ao momento não foi possível ainda a elucidação do composto, contudo tentou-se também outras abordagens, como a existência de dois grupos metilo e de um carbono quaternário difícil de identificar devido a sobreposições no espectro de ^{13}C .

Proposta A:

- Os grupos carbonilo vão de encontro ao proposto: dois simétricos e um terceiro com um ligeiro desvio.
- A presença de três amidas terciárias, compatíveis com o espectro de ^1H que não indica a presença de $-\text{NH}$.
- Contudo os desvios de ^1H indicados na literatura e previstos pelo *ChemDraw* não coincidem com os nossos valores para H-19 e H-20.
- Também não é possível determinar com clareza o número de grupos metilo.
- O íão molecular da estrutura A também não coincide com o esperado.

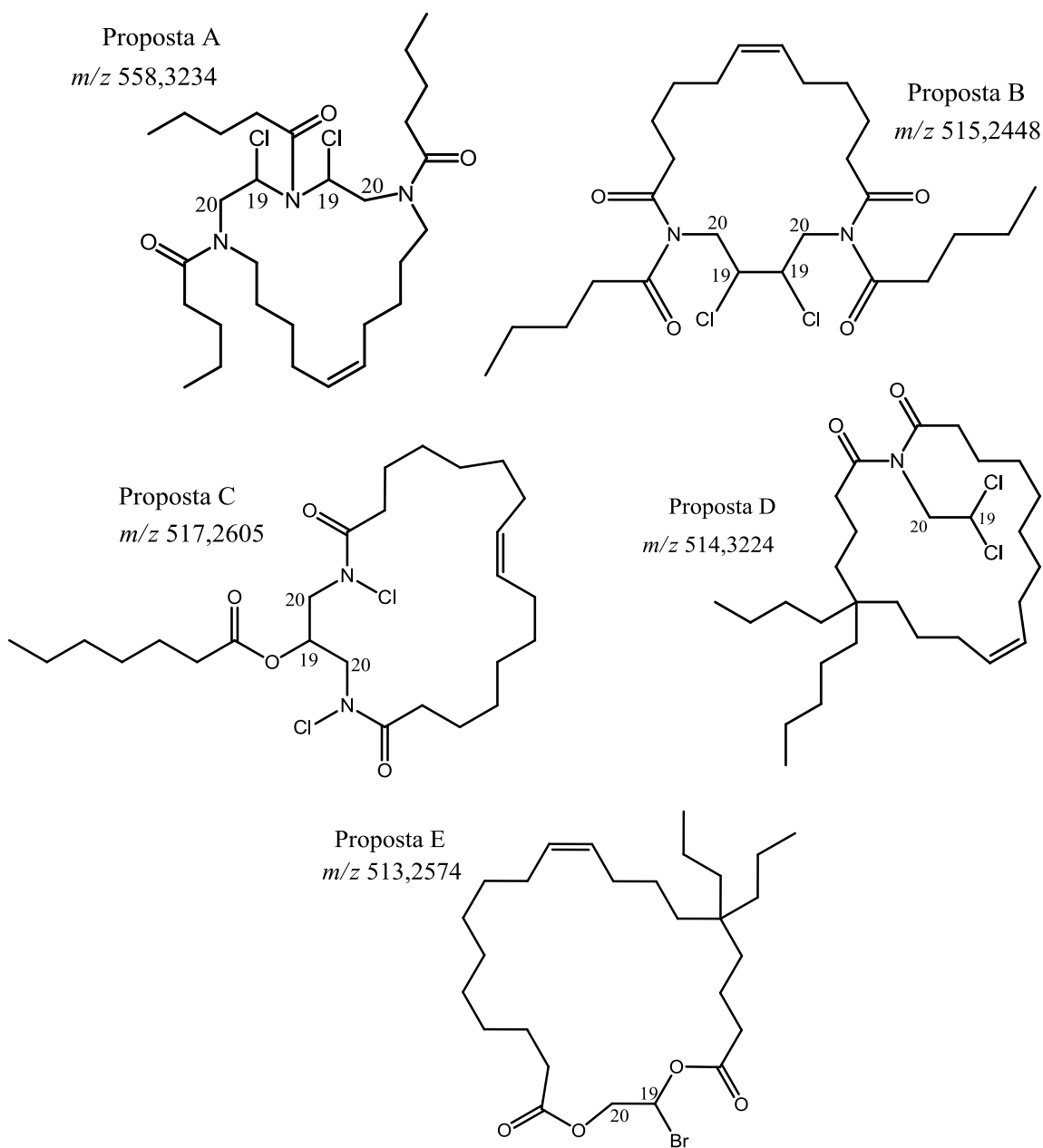


FIGURA III-7 – PROPOSTA PARA A ESTRUTURA PTM-420-F4-F15

Proposta B:

- Nesta proposta são sugeridos quatro grupos carbonilo, o que não vai de encontro às conclusões retiradas da análise do espectro ^{13}C .
- Os desvios de C-19 e C-20 também não coincidem com o esperado.
- O ião molecular não corresponde ao obtido na espectrometria de massa.
- A molécula apresenta simetria.
- Desta forma, devido às divergências entre a proposta e os resultados obtidos, esta estrutura serviu para eliminar outras possibilidades.

Proposta C:

- Existem três grupos carbonilo, dois em ambiente químico idêntico, o que está de acordo com a informação do espectro de ^{13}C .
- Os desvios da parte cíclica da estrutura proposta correspondem ao esperado.
- A cadeia linear também respeita os dados de RMN.
- C-19 e C-20 apresentam desvios semelhantes com o esperado. O mesmo não se verifica para H-19 e H-20.
- No entanto m/z não é o esperado e não há referência de ligações N-Cl em produtos naturais.

Proposta D:

- Os desvios dos grupos carbonilo da imida são semelhantes ao esperado, assim como os desvios da parte cíclica da estrutura. Nesta proposta considera-se que a existência de um terceiro grupo carbonilo não ocorria, sendo o mesmo contaminação.
- Os desvios de H-19 e H-20 da estrutura proposta são semelhantes aos obtidos pelo RMN. No entanto, o mesmo não se verifica para C-20 que apresenta um desvio químico um pouco diferente ao obtido no espectro ^{13}C .

Proposta E:

- O ião molecular desta estrutura proposta apresenta um valor muito semelhante aos resultados da espectrometria de massa. No entanto a estrutura não apresenta os dois átomos de Cl nem o terceiro carbonilo.
- Os desvios de C-19 e C-20 previstos para a proposta também não vão de encontro ao esperado.
- A estrutura também não apresenta um eixo de simetria.

Muitas outras hipóteses foram testadas, como a existência de duas duplas ligações, a presença de enxofre (excluída pela espectrometria de fragmentação) e outros grupos funcionais comuns nos produtos naturais foram também considerados. Ainda assim não foi

possível chegar a uma estrutura que obedeça a todas as condições dos vários espectros analisados.

A solução para este problema passará por isolar maior quantidade dos compostos pertencentes a esta família e tentar encontrar informação adicional útil nesses espectros. Por outro lado o composto PTM-420-F4-F15 encontra-se a cristalizar /éter dietílico/ isooctano) para cristalografia de raios-X.

IV. CONCLUSÕES

Desta dissertação resultaram 104 compostos isolados da estirpe PTM-420, dos quais:

- ❖ 75 compostos pertenciam à família napiradiomicina;
- ❖ 8 compostos pertencem à família macrólido e tudo indica que as suas estruturas são novas;
- ❖ 31 compostos apresentaram atividade contra MRSA COL com MIC's entre 250 – 1,95 µg/mL;
- ❖ 38 compostos apresentaram atividade contra VRE EF82 com MIC's entre 250 – 1,95 µg/mL;
- ❖ 6 compostos apresentaram percentagens de inibição de biofilmes clínicos de *S. aureus* superiores a 60%, sendo que os compostos serão testados para fins industriais;
- ❖ 10 compostos apresentaram atividade anti-incrustante contra larvas de mexilhão *mytilus galloprovincialis* e contra biofilmes de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*..

Foram totalmente elucidadas 6 estruturas (PTM-420-F2+F3-F20, PTM-420-F2+F3-F22, PTM-420-F35, PTM-420-F2+F3-F39A e B, e PTM-420-F4-F25), pertencentes à família das napiradiomicinas que apresentam percentagens de inibição de biofilmes marinhos de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* superiores a 60%.

- ❖ Os derivados da família napiradiomicina PTM-420-F2+F3-F35 e PTM-420-F4-F25 descritos nesta dissertação encontram-se a ser explorados para fins industriais.

Verificou-se a existência de uma nova família de macrólidos, tendo sido identificados, até ao momento, 8 compostos pertencentes à mesma família. Contudo as estruturas ainda não estão completamente elucidadas. Dos dados de RMN analisados não existem desvios de ^1H e ^{13}C correspondentes a unidades terpenóides. Desta forma os compostos podem derivar de uma via biossintética distinta, podendo esta ser novidade no agrupamento MAR4.

Através da realização desta tese foi possível apurar que as napiradiomicinas isoladas da estirpe PTM-420 não possuem um grupo metilo na posição 6, contrariamente às napiradiomicinas isoladas da estirpe PTM-29, sendo que ambas as estirpes são *Streptomyces aculeolatus*. Através deste facto pode-se concluir que o genoma desta estirpe ainda está sub-explorado, podendo depender do ambiente onde as estirpes são recolhidas: a estirpe PTM-420 ao largo das Ilhas Desertas a 15 metros de profundidade, enquanto a estirpe PTM-29 foi recolhida ao largo da Ilha da Madeira, a 728 metros de profundidade.

V. PERSPETIVAS FUTURAS

- ❖ Repetir o processo de isolamento dos compostos da nova família de macrólidos para permitir novas abordagens à elucidação.
- ❖ Elucidar os compostos enumerados na tese como sendo de interesse devido à sua atividade biológica.
- ❖ Através do espectro de UV pensa-se que existem 3 compostos (PTM-420-F2+F3-F17, PTM-420-F4-F19 e PTM-420-F5-F23) pertencentes à família marinona. Apesar de não terem demonstrado atividade biológica relevante, seria de interesse proceder à elucidação dos mesmos com o intuito de verificar a produção de novos derivados desta família.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Bérdy, J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **58**, 1–26 (2005).
2. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3670–3695 (2013).
3. Fenical, W. & Jensen, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 666–673 (2006).
4. Solanki, R., Khanna, M., Lal, R. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol* **48**, 410–431 (2008).
5. Vicente, J., Stewart, A., Song, B., Hill, R. T. & Wright, J. L. Biodiversity of Actinomycetes Associated with Caribbean Sponges and Their Potential for Natural Product Discovery. *Mar. Biotechnol.* **15**, 413–424 (2013).
6. Gerwick, W. H. & Moore, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem. Biol.* **19**, 85–98 (2012).
7. Hu, Y. *et al.* Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Mar. Drugs* **13**, 202–221 (2015).
8. Subramani, R. & Aalbersberg, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* **167**, 571–580 (2012).
9. Lam, K. S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 245–251 (2006).
10. Gallagher, K. a, Rauscher, K., Pavan loca, L. & Jensen, P. R. Phylogenetic and chemical diversity of a hybrid-isoprenoid-producing streptomycete lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 6894–902 (2013).
11. Gallagher, K. A., Fenical, W. & Jensen, P. R. Hybrid isoprenoid secondary metabolite production in terrestrial and marine actinomycetes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 794–800 (2010).
12. Gallagher, K. A. & Jensen, P. R. Genomic insights into the evolution of hybrid isoprenoid biosynthetic gene clusters in the MAR4 marine streptomycete clade. *BMC Genomics* **16**, 960 (2015).
13. Motohashi, K., Sue, M., Furihata, K., Ito, S. & Seto, H. Terpenoids produced by Actinomycetes: Napyradiomycins from *Streptomyces antimycoticus* NT17. *J. Nat. Prod.*

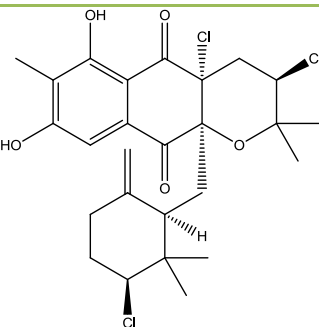
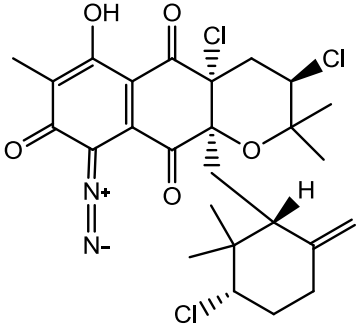
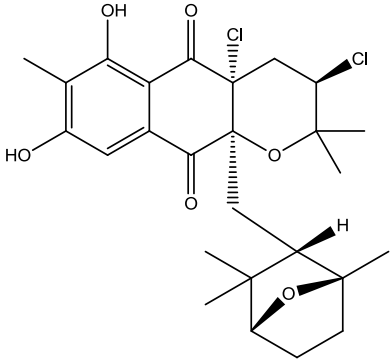
- 71**, 595–601 (2008).
14. Kuzuyama, T. & Seto, H. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 171–183 (2003).
 15. Xiao, Y., Machacek, M., Lee, K., Kuzuyama, T. & Liu, P. Prenyltransferase substrate binding pocket flexibility and its application in isoprenoid profiling. *Mol. Biosyst.* **5**, 913–7 (2009).
 16. Wu, Z. *et al.* Antibacterial and cytotoxic new napyradiomycins from the marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 10428. *Mar. Drugs* **11**, 2113–2125 (2013).
 17. Winter, J. M. *et al.* Molecular basis for chloronium-mediated meroterpene cyclization: Cloning, sequencing, and heterologous expression of the napyradiomycin biosynthetic gene cluster. *J. Biol. Chem.* **282**, 16362–16368 (2007).
 18. Kalaitzis, J. A., Hamano, Y., Nilsen, G. & Moore, B. S. Biosynthesis and Structural Revision of Neomarinone. *Org. Lett.* **5**, 4449–4452 (2003).
 19. Ding, X.-B., Brimble, M. A. & Furkert, D. P. Nitropyrrole natural products: isolation, biosynthesis and total synthesis. *Org. Biomol. Chem.* (2016). doi:10.1039/C5OB02599K
 20. Blankenfeldt, W. *et al.* Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16431–16436 (2004).
 21. Qin, Z. *et al.* Disruption of a methyltransferase gene in actinomycin G gene cluster in *Streptomyces iakyrus* increases the production of phenazinomycin. *FEMS Microbiol. Lett.* **352**, 62–68 (2014).
 22. Zeyhle, P. *et al.* A membrane-bound prenyltransferase catalyzes the O-prenylation of 1,6-dihydroxyphenazine in the marine bacterium *streptomyces* sp. CNQ-509. *ChemBioChem* **15**, 2385–2392 (2014).
 23. Cho, J. Y. *et al.* Actinofuranones A and B , Polyketides from a Marine-Derived Bacterium Related to the Genus. *J. Nat. Prod.* **61**, 425–428 (2006).
 24. Deshpande, B. S., Ambedkar, S. S. & Shewale, J. G. Biologically active secondary metabolites from *Streptomyces*. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 455–473 (1988).
 25. Kittendorf, J. D. & Sherman, D. H. The methymycin/pikromycin pathway: A model for metabolic diversity in natural product biosynthesis. *Bioorganic Med. Chem.* **17**, 2137–2146 (2009).
 26. Fjærvik, E. & Zotchev, S. B. Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in

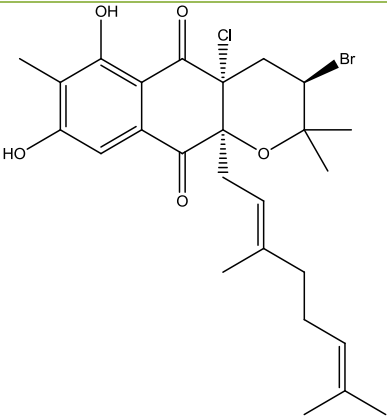
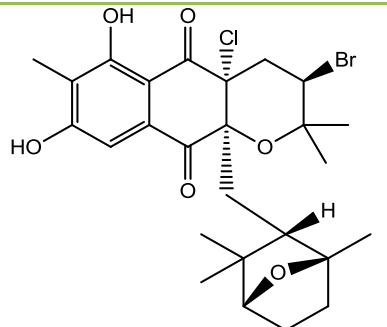
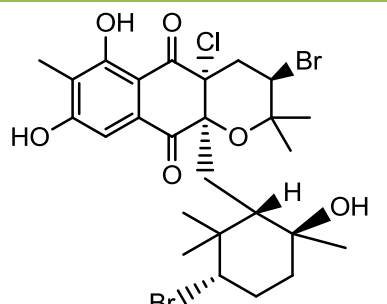
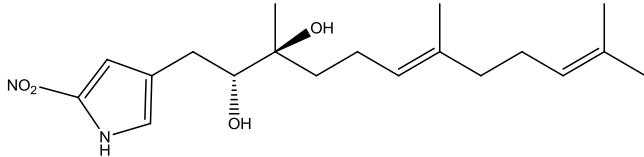
- Streptomyces noursei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 436–443 (2005).
27. Han, S. *et al.* Functional characterization of CYP107W1 from *Streptomyces avermitilis* and biosynthesis of macrolide oligomycin A. *Arch. Biochem. Biophys.* **575**, 1–7 (2015).
 28. Hagan, D. O., Robinson, J. A. & Turner, D. L. Biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. Origin of the oxygen atoms in tylactone. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1337–1340 (1983).
 29. Gill, S. R. *et al.* Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J. Bacteriol.* **187**, 2426–2438 (2005).
 30. Mato, R. *et al.* Assessment of high-level gentamicin and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* clonal structure in a Portuguese hospital over a 3-year period. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 855–859 (2009).
 31. Fuda, C. C. S., Fisher, J. F. & Mobashery, S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2617–2633 (2005).
 32. Stefani, S. *et al.* Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**, 273–282 (2012).
 33. Peres, D. R. V. Caracterização Epidemiológica do *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) num Hospital Distrital do Grande Porto e Sua Percepção pelos Profissionais de Saúde. (Universidade do Porto, 2007).
 34. Cetinkaya, Y., Falk, P. & Mayhall, C. G. Vancomycin-resistant *enterococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 686–707 (2000).
 35. Uttley, A. H. C., Collins, C. H., Naidoo, J. & George, R. C. Vancomycin-resistant *enterococci*. *Lancet* **13**, 57–58 (1988).
 36. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, M. C. Colorectal cancer statistics. (2014). Available at: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/colorectal-cancer-statistics>.
 37. Olano, C., Méndez, C. & Salas, J. A. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar. Drugs* **7**, 210–248 (2009).
 38. Balagurunathan, R., Sangeetha, M., Shanmugasundaram, T. Anti-biofilme compounds from Actinobacteria. *ENVIS Newsl.* **13**, 2–5 (2015).

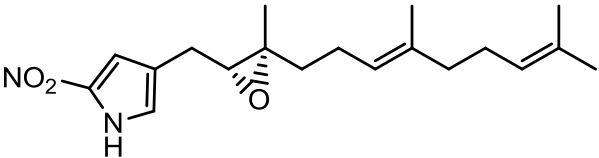
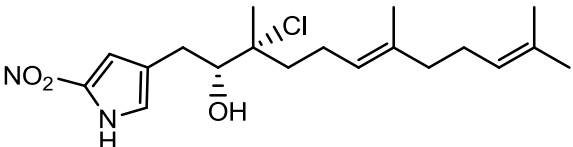
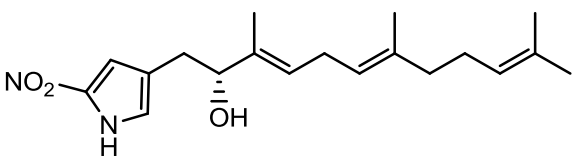
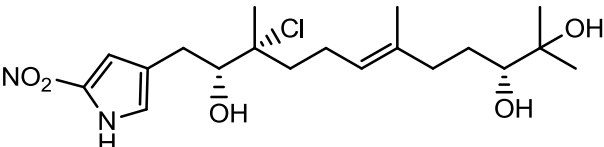
39. Li, Y. X. *et al.* Antifouling Activity of Secondary Metabolites Isolated from Chinese Marine Organisms. *Mar. Biotechnol.* **15**, 552–558 (2013).
40. Almeida, E. A., Diamantino, T. D. & Sousa, O. de S. Breve história das tintas antivegetativas. *Corrosão e Proteção Mater.* **26**, 6–12 (2007).
41. Clark, W., Still, W. C., Kahn, M. & Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **43**, 2923–2925 (1978).
42. Shiomi, K. *et al.* Structures of New Antibiotics Napyradiomycins. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 494–501 (1986).
43. Cheng, Y. Bin, Jensen, P. R. & Fenical, W. Cytotoxic and antimicrobial napyradiomycins from two marine-derived *streptomyces* strains. *European J. Org. Chem.* 3751–3757 (2013). doi:10.1002/ejoc.201300349
44. Haste, N. M. *et al.* Bactericidal kinetics of marine-derived napyradiomycins against contemporary methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mar. Drugs* **9**, 680–689 (2011).
45. Farnaes, L. *et al.* Napyradiomycin derivatives, produced by a marine-derived actinomycete, illustrate cytotoxicity by induction of apoptosis. *J. Nat. Prod.* **77**, 15–21 (2014).
46. Kwon, H. C. *et al.* Nitropyrrolins A-E, cytotoxic farnesyl- α -nitropyrroles from a marine-derived bacterium within the actinomycete family *streptomycetaceae*. *J. Nat. Prod.* **73**, 2047–2052 (2010).
47. Gomi, S., Ohuchi, S., Sasaki, T., Itoh, J. & Sezaki, M. Studies on new antibiotics SF2415. II. The structural elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **40**, 740–749 (1987).
48. Umezawaf, K., Masuoka, S., Ohsef, T. & Naganawaft, H. Isolation from *Streptomyces* of a Novel Naphthoquinone Compound , Naphthablin , That Inhibits Abl Oncogene Functions. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **48**, 604–607 (1995).
49. Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* **435**, 983–7 (2005).

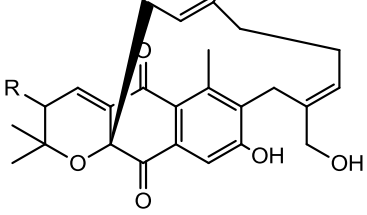
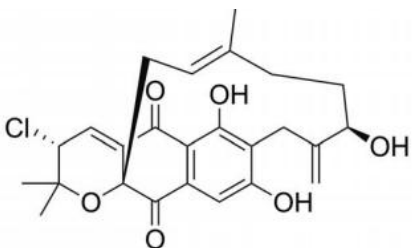
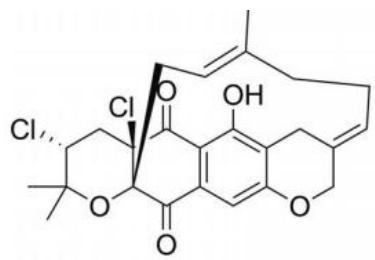
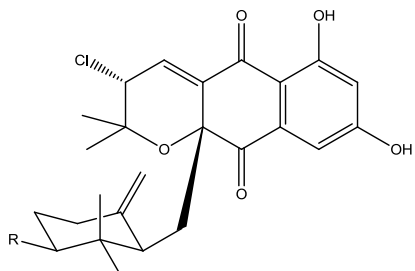
VII. ANEXOS

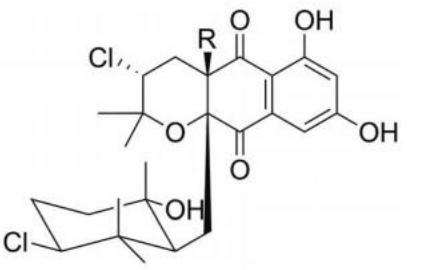
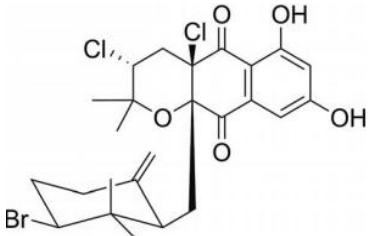
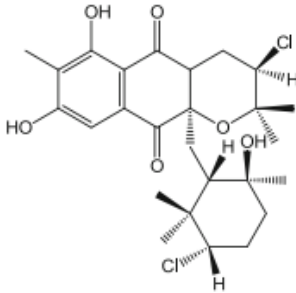
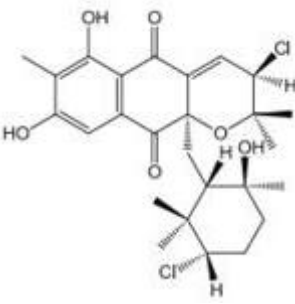
1. ESTRUTURAS PRODUZIDAS POR *S. ACULEOLATUS* REPORTADASTabela vii-1 – Estruturas reportadas como sendo produzidas pela estirpe *S. aculeolatus*

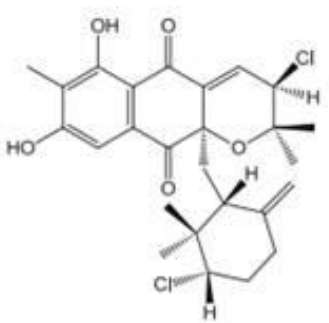
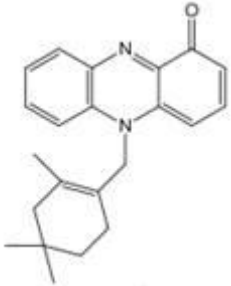
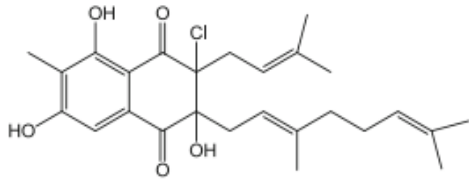
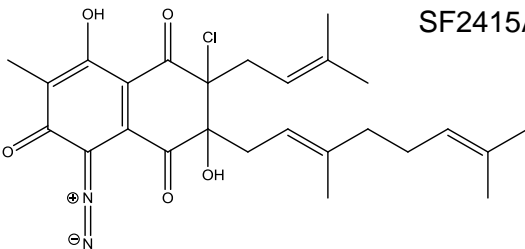
ESTRUTURA/ NOME	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
 <p>A80915A</p>	MRSA	44
 <p>A80915</p>	MRSA	44
 <p>CNQ525.510</p>	Anticancerígena (HCT-116)	45

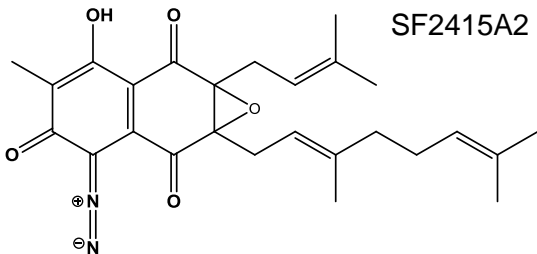
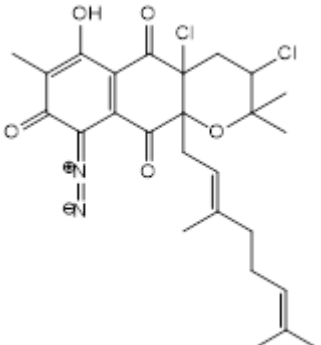
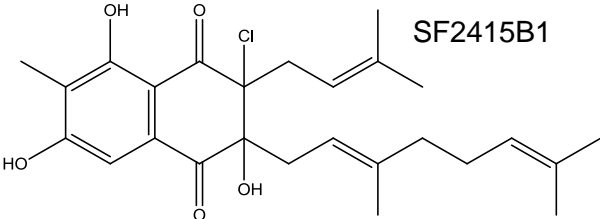
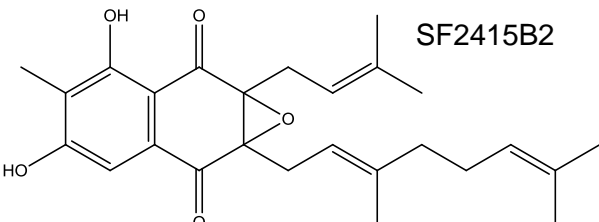
ESTRUTURA/ NOME	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
 <p>CNQ525.538</p>	Anticancerígena (HCT-116)	45
 <p>CNQ525.51</p>	Anticancerígena (HCT-116)	45
 <p>CNQ525.60</p>	Anticancerígena (HCT-116)	45
<p>Nitropirrolina A</p> 	Anticancerígena (HCT-116) MRSA	46

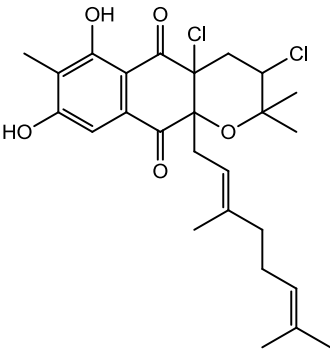
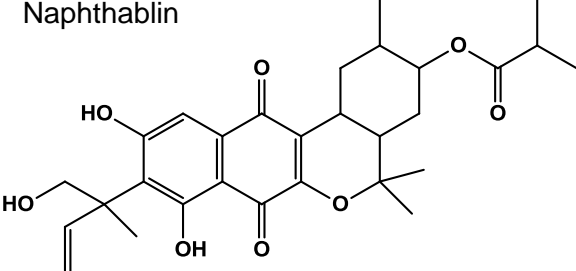
ESTRUTURA/ NOME	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<p>Nitropirrolina B</p> 	Anticancerígena (HCT-116)	46
<p>Nitropirrolina C</p> 	Sem atividade significativa para HCT-116 e MRSA	46
<p>Nitropirrolina D</p> 	Anticancerígena (HCT-116)	46
<p>Nitropirrolina E</p> 	Sem atividade significativa para HCT-116 e MRSA	46

ESTRUTURA/ NOME	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<p>Napiradiomicina 1, R= α-Cl</p> <p>Naniradiomicina 2 R= R-OH</p> 	<p>Anticancerígena (HCT-116)</p> <p>MRSA</p>	<p>43</p>
<p>Napiradiomicina 3</p> 	<p>Anticancerígena (HCT-116)</p> <p>MRSA</p>	<p>43</p>
<p>Napiradiomicina 4</p> 	<p>Anticancerígena (HCT-116)</p> <p>MRSA</p>	<p>43</p>
<p>Napiradiomicina 5, R= Cl</p> <p>Napiradiomicina 7. R= Br</p> 	<p>Anticancerígena (HCT-116)</p> <p>MRSA</p>	<p>43</p>

ESTRUTURA/ NOME	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<p>Napiradiomicina 6, R= H</p> 	<p>Anticancerígena (HCT-116)</p> <p>MRSA</p>	<p>43</p>
<p>Napiradiomicina 9</p> 	<p>Anticancerígena (HCT-116)</p> <p>MRSA</p>	<p>43</p>
 <p>Cloro-Dihidroquinona 1</p>	<p>Antibiótica</p>	<p>5</p>
 <p>Cloro-Dihidroquinona 2</p>	<p>Antibiótica</p>	<p>5</p>

ESTRUTURA/ NOME	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
 <p>Cloro-Dihidroquinona 3</p>	Antibiótica	5
 <p>WS-9659</p>	Antibiótica	5
<p>Naphthomevalin</p> 	Antibiótica	5
 <p>SF2415A1</p>	MRSA	47

ESTRUTURA/ NOME	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
	MRSA	47
	MRSA	47
	MRSA	47
	MRSA	47

ESTRUTURA/ NOME	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
 <p>SF2415B3</p>	MRSA	47
<p>Naphthablin</p> 	Inibidor da função oncogénica da abl	48

2. CROMATOGRAMAS OBTIDOS DA ESTIRPE PTM-420

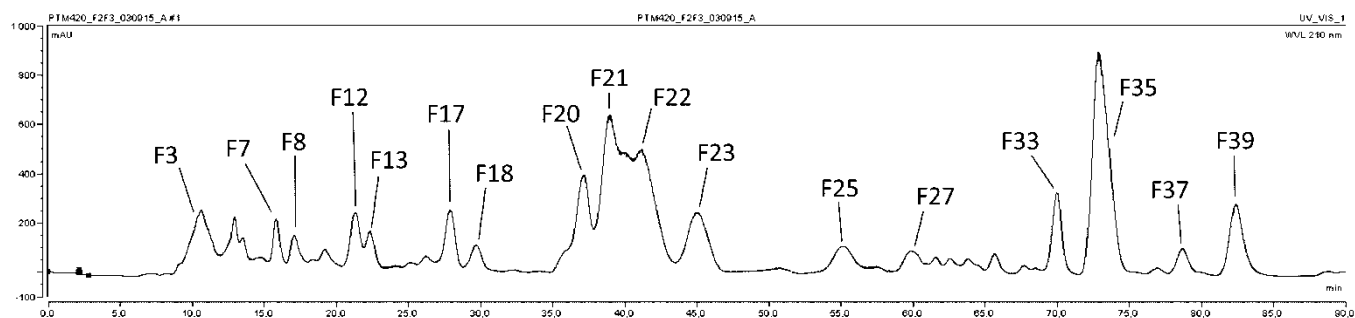


Figura vii-1 – Cromatograma F2+F3. Compostos isolados e tempos de retenção

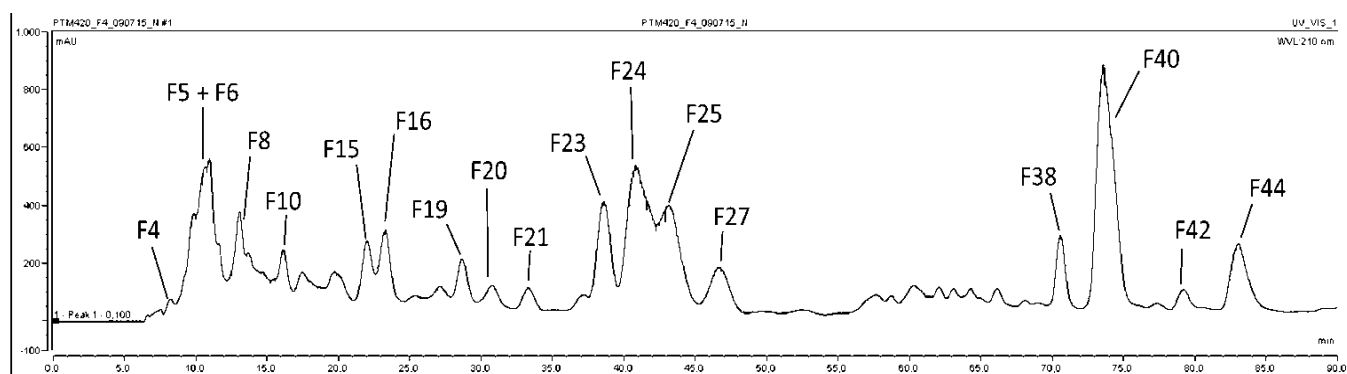


Figura vii-2 - Cromatograma F4. Compostos isolados e tempos de retenção

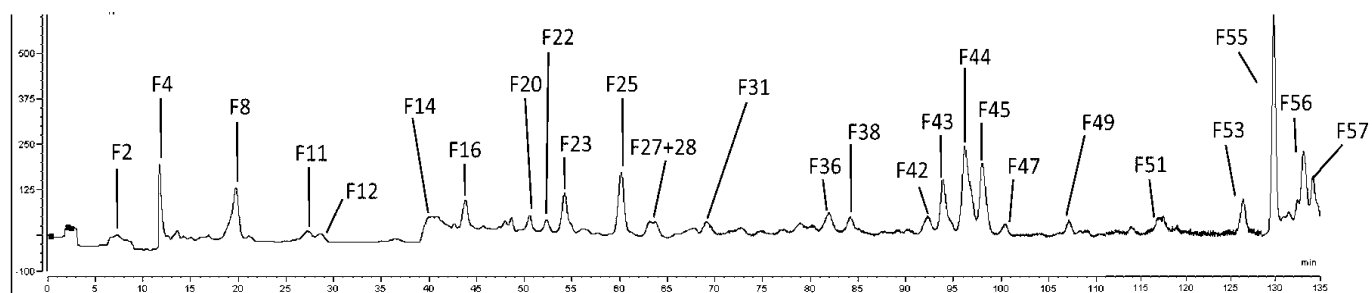


Figura vii-3 - Cromatograma F5. Compostos isolados e tempos de retenção

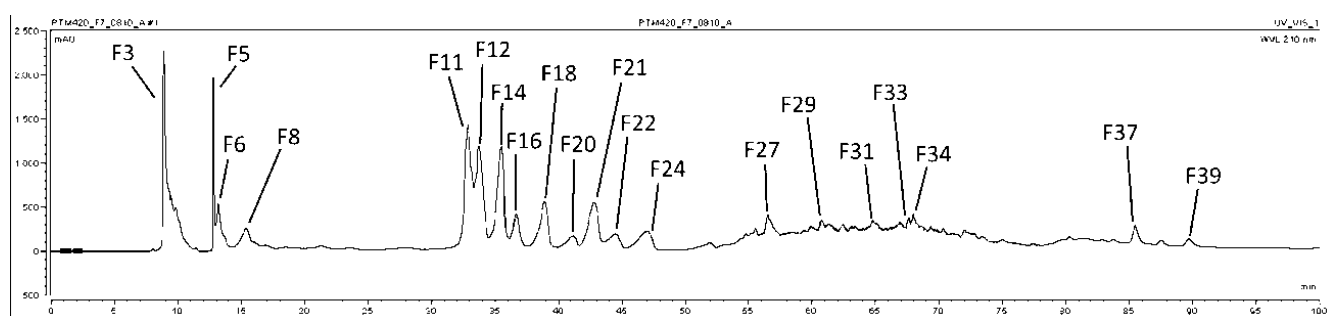


Figura vii-4 - Cromatograma F7. Compostos isolados e tempos de retenção

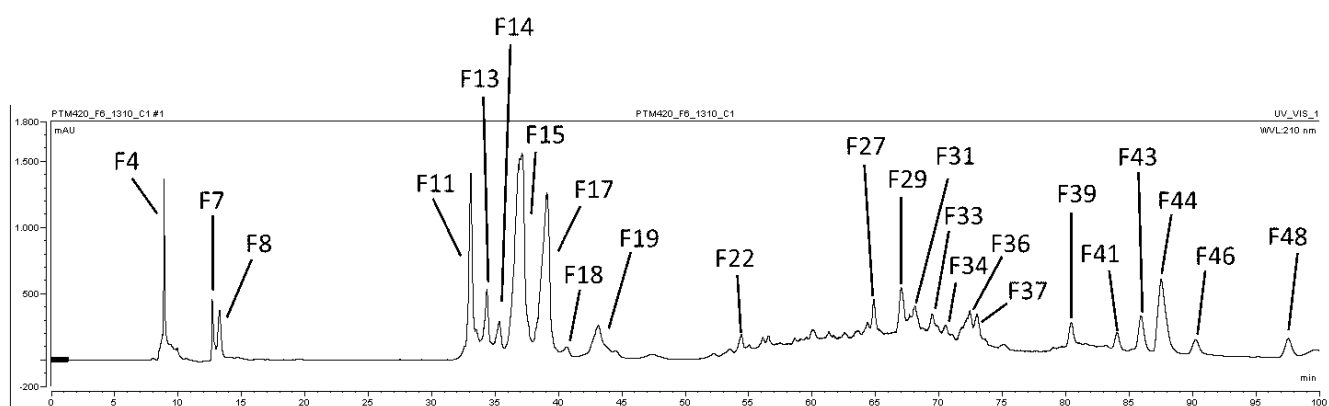


Figura vii-5 - Cromatograma F6. Compostos isolados e tempos de retenção

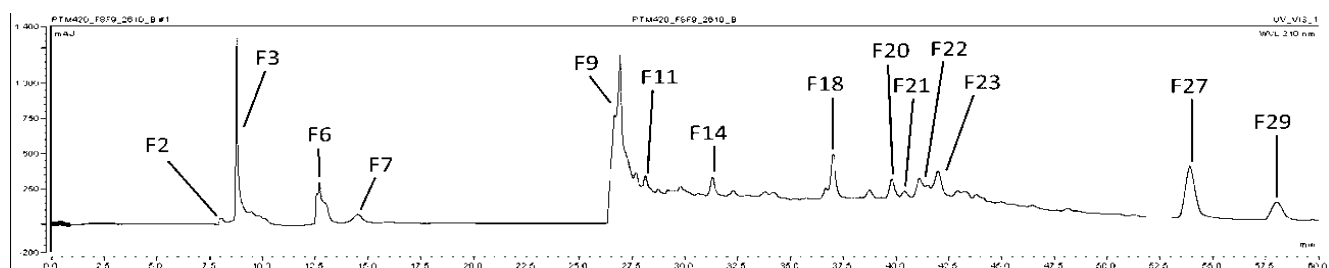


Figura vii-6 - Cromatograma F8+9. Compostos isolados e tempos de retenção

3. ESPECTROS PTM-420-F2+F3-F20

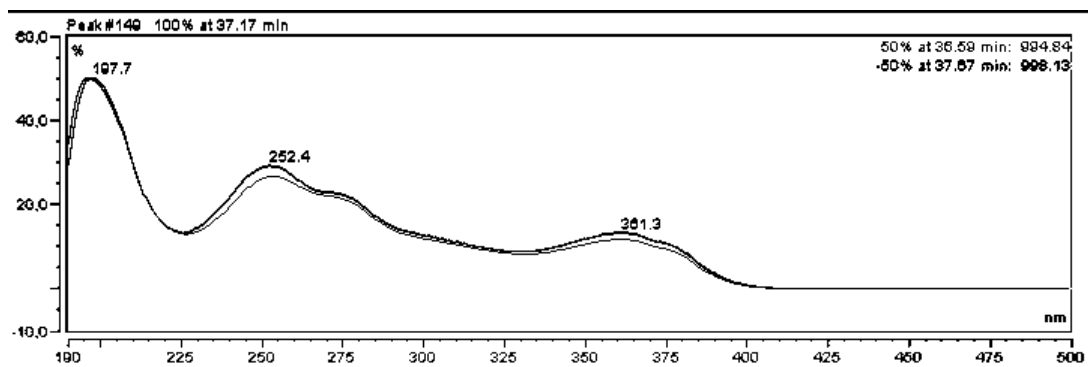


Figura vii-7 - Perfil UV do composto PTM-420-F2+F3-F20

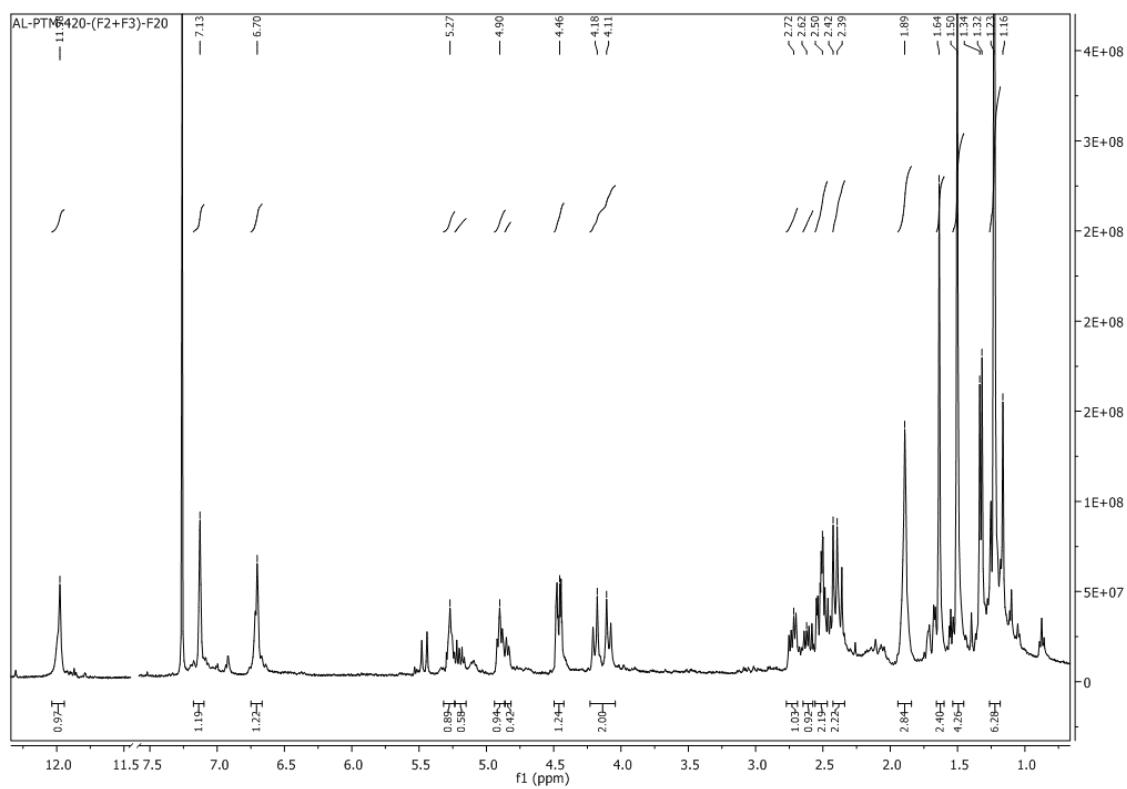


Figura vii-8 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3

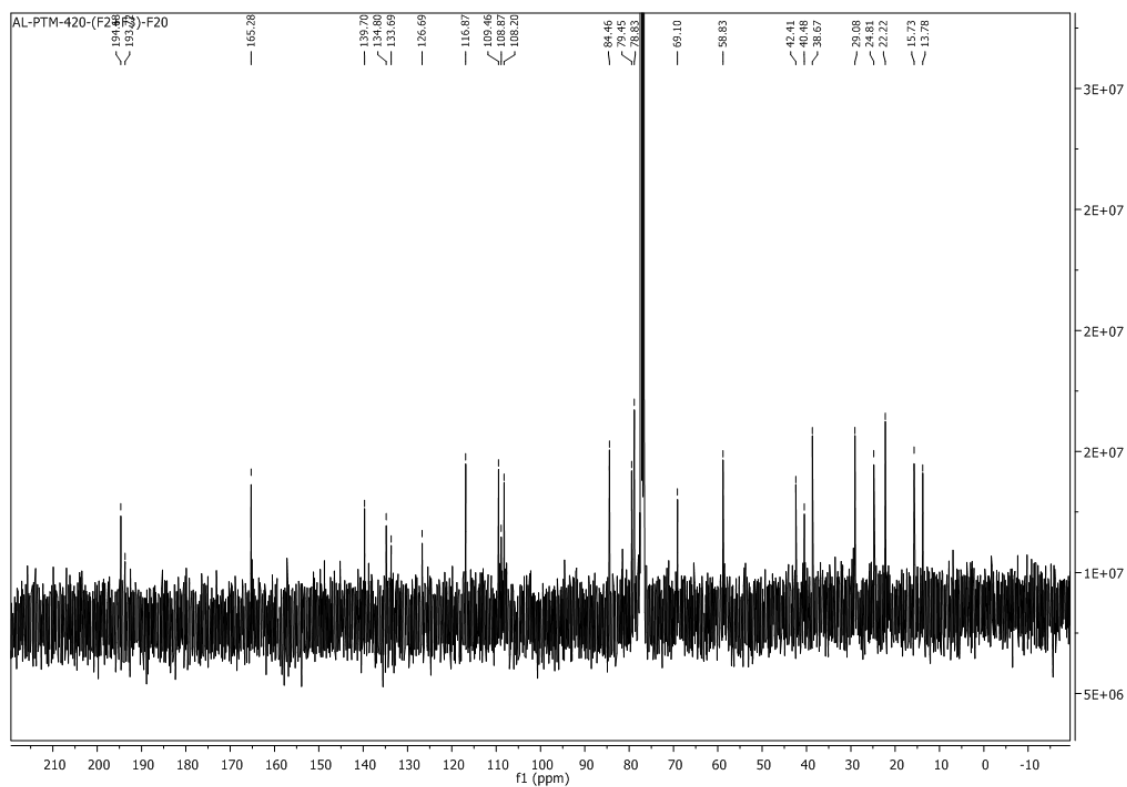


Figura vii-9 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3

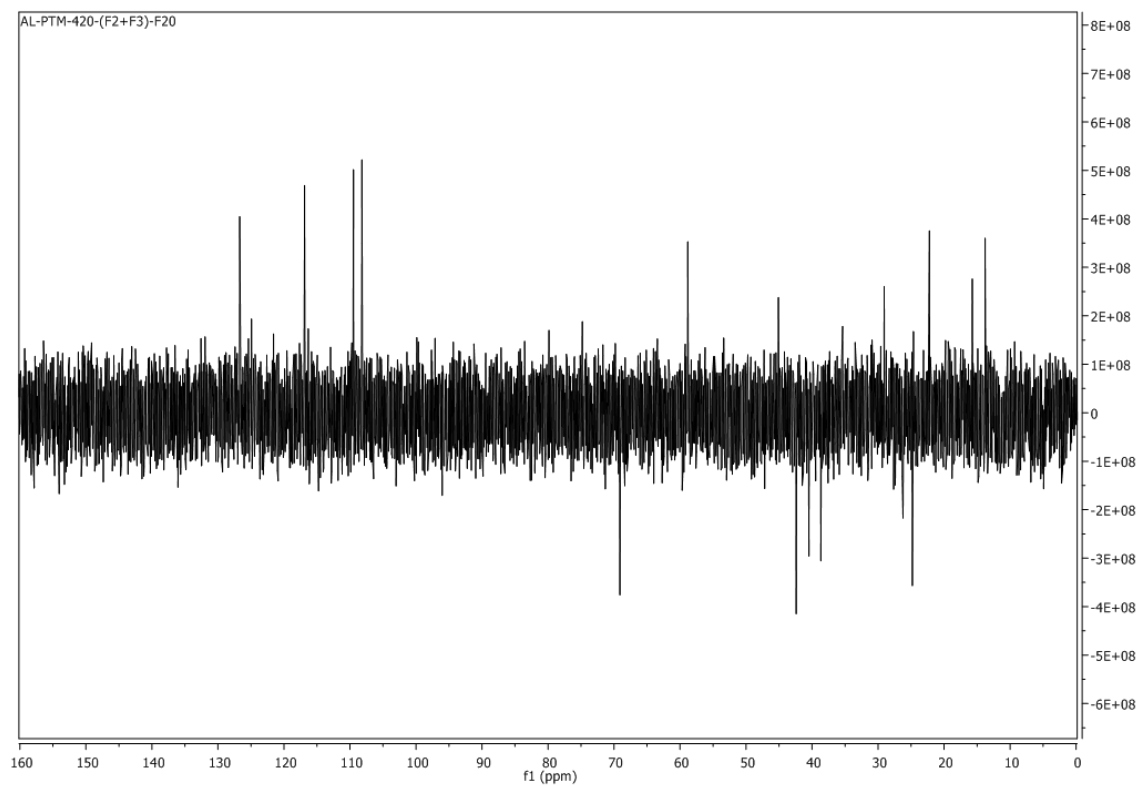


Figura vii-10 – Espectro ^{13}C DEPT 135 do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3

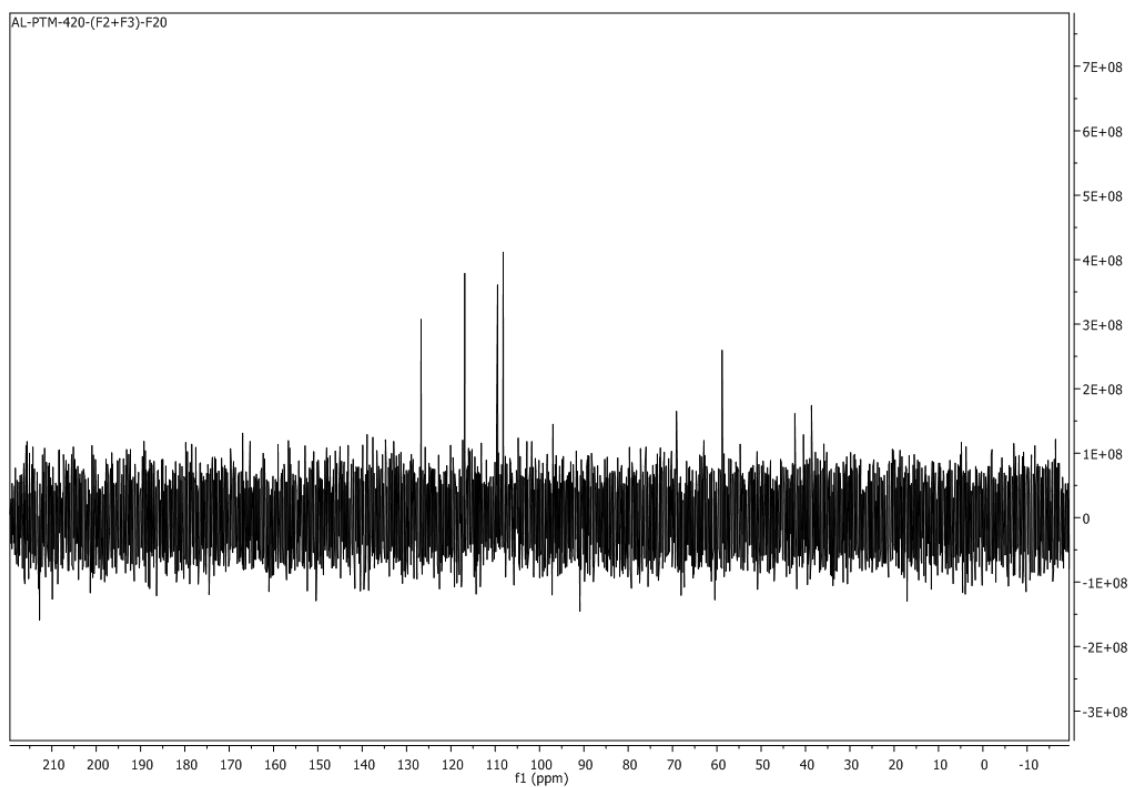


Figura vii-11 - Espectro ^{13}C DEPT 90 do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3

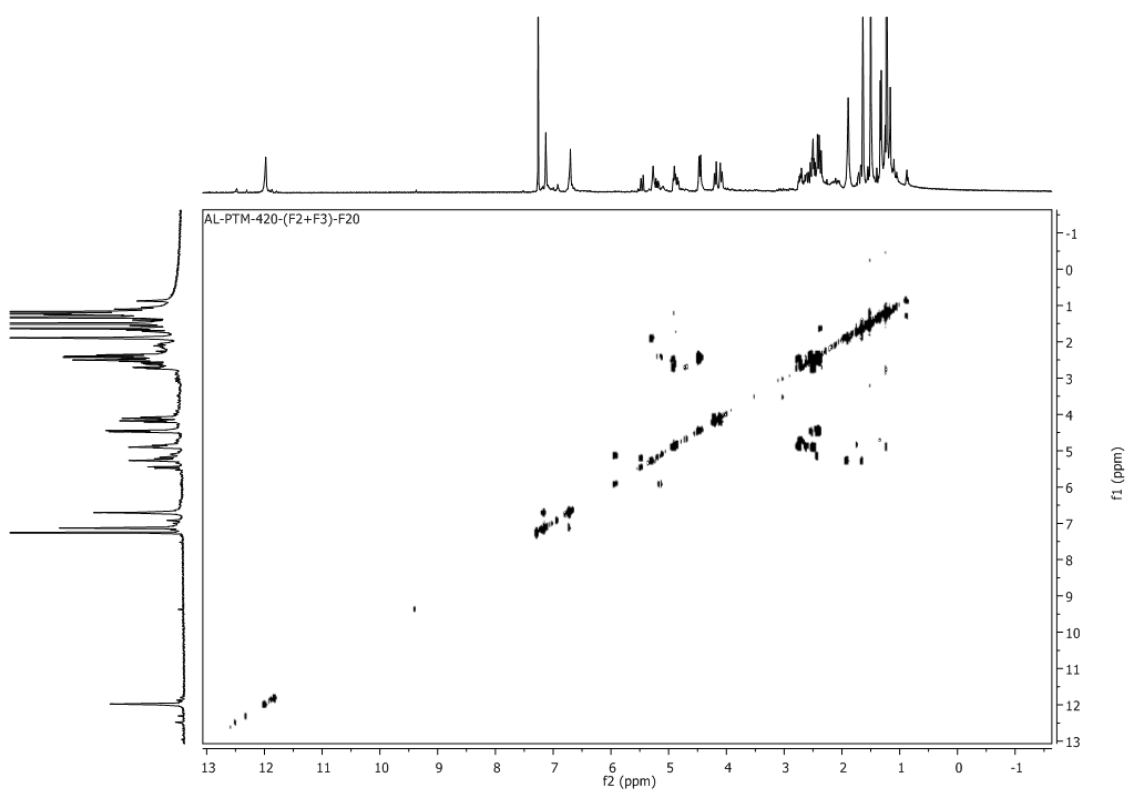
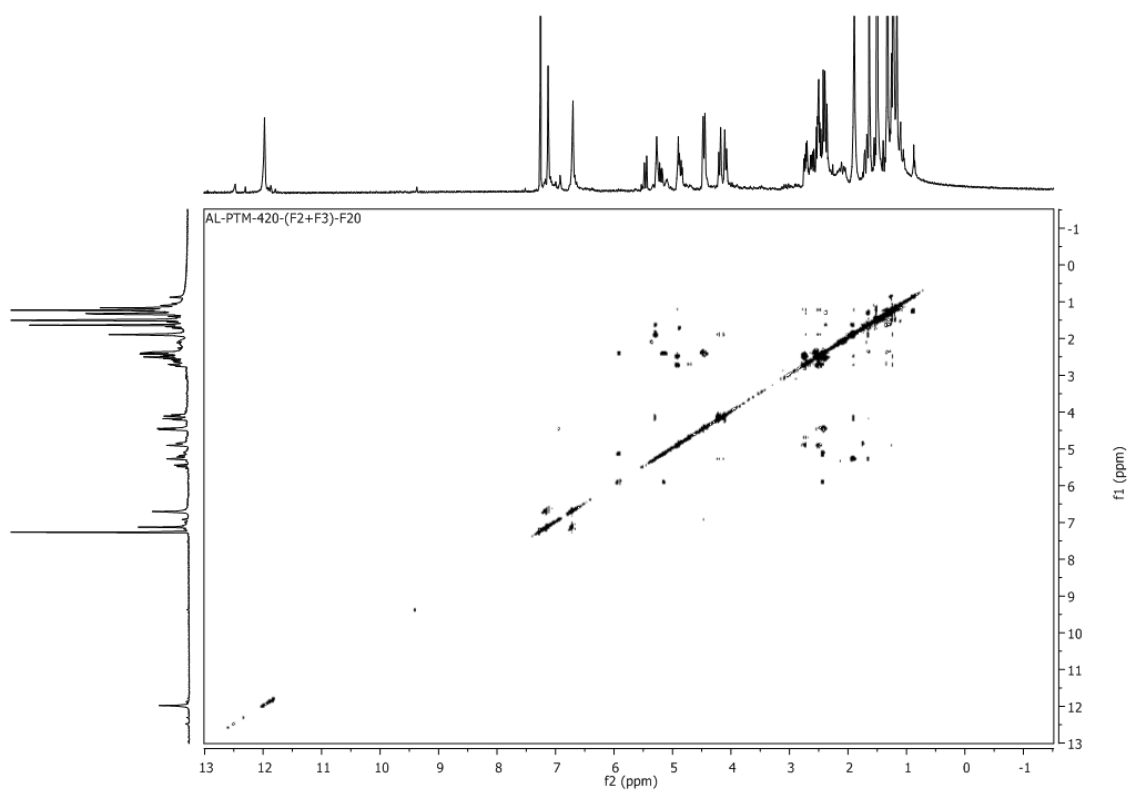
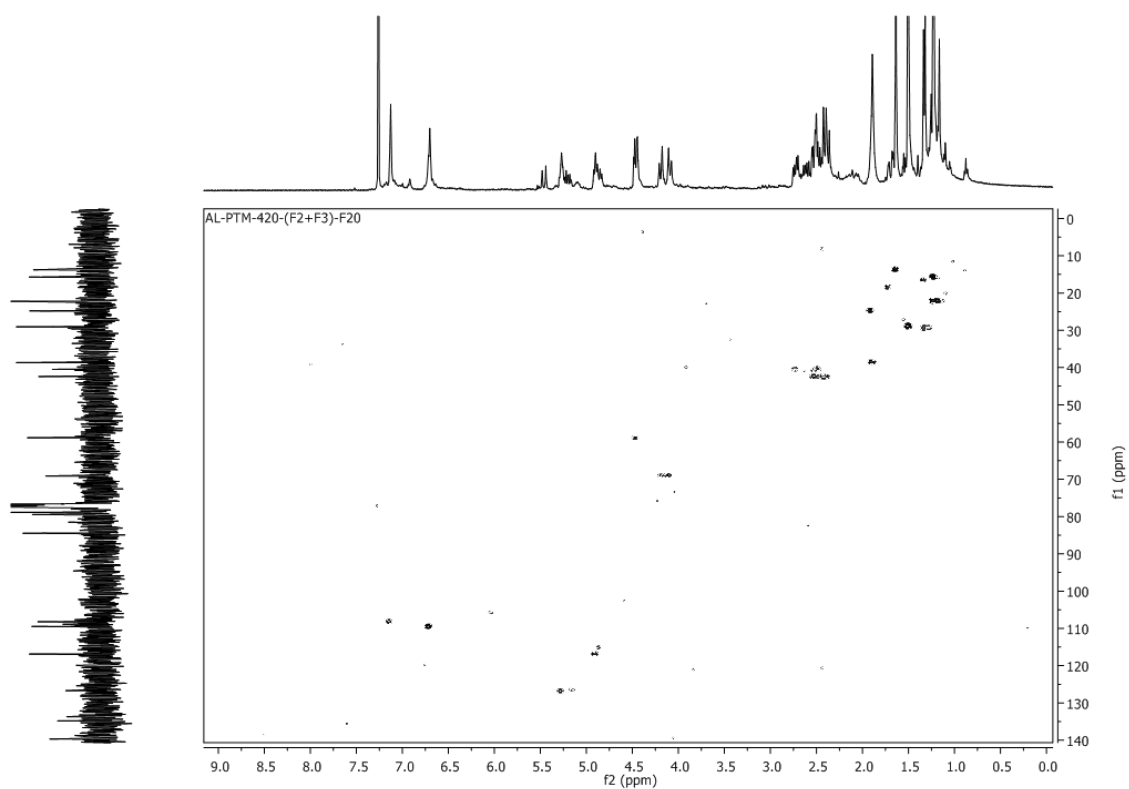


Figura vii-12 - Espectro COSY do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3

Figura vii-13 - Espectro TOCSY do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3 Figura vii-14 - Espectro HSQC do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3

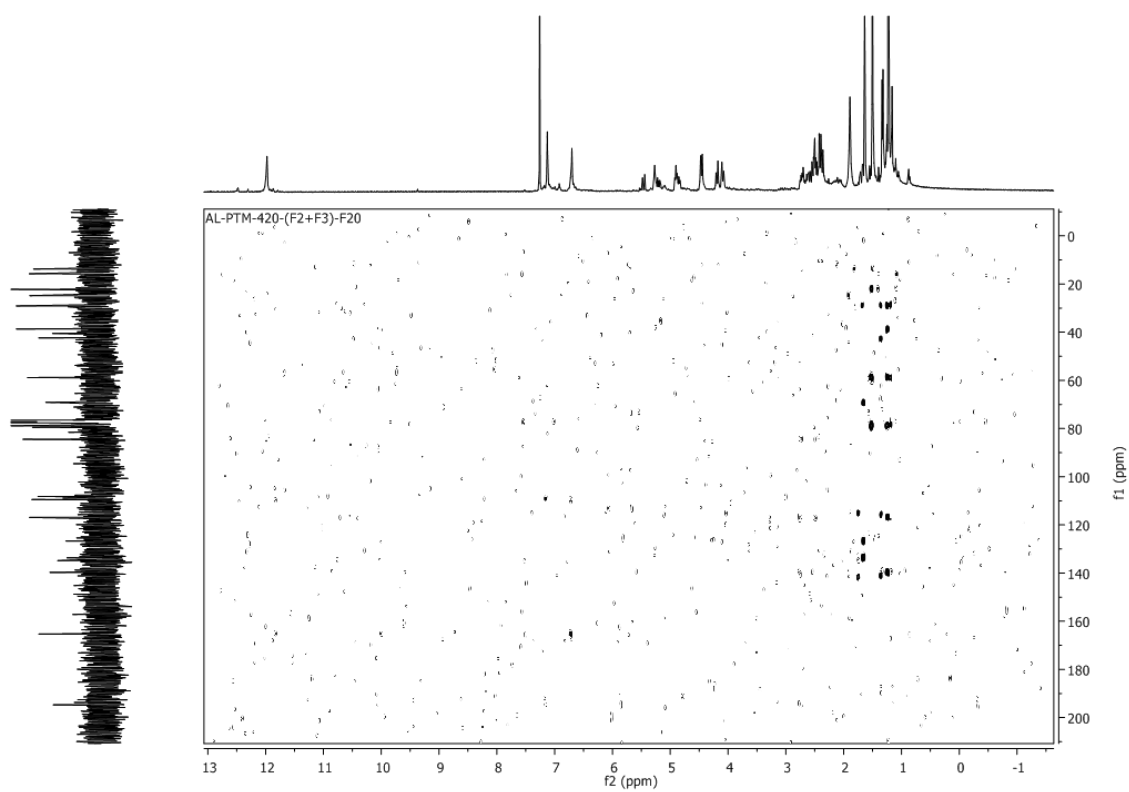


Figura vii-15 - Espectro HMBC do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3

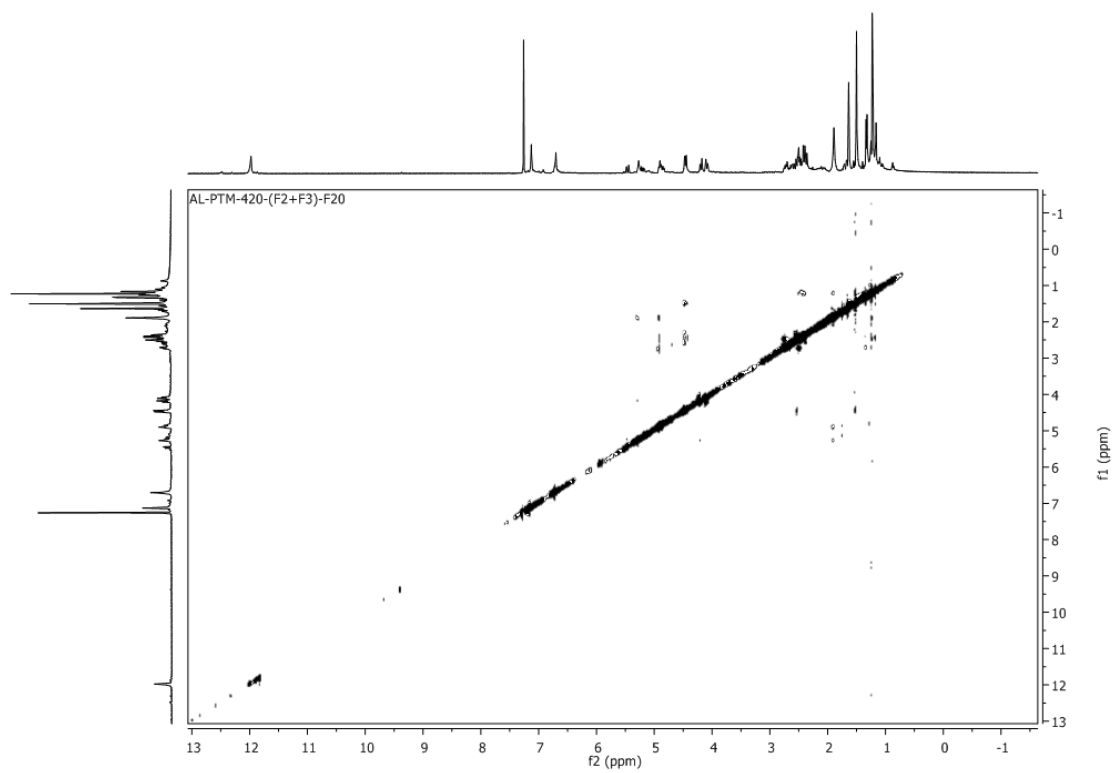


Figura vii-16 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl_3

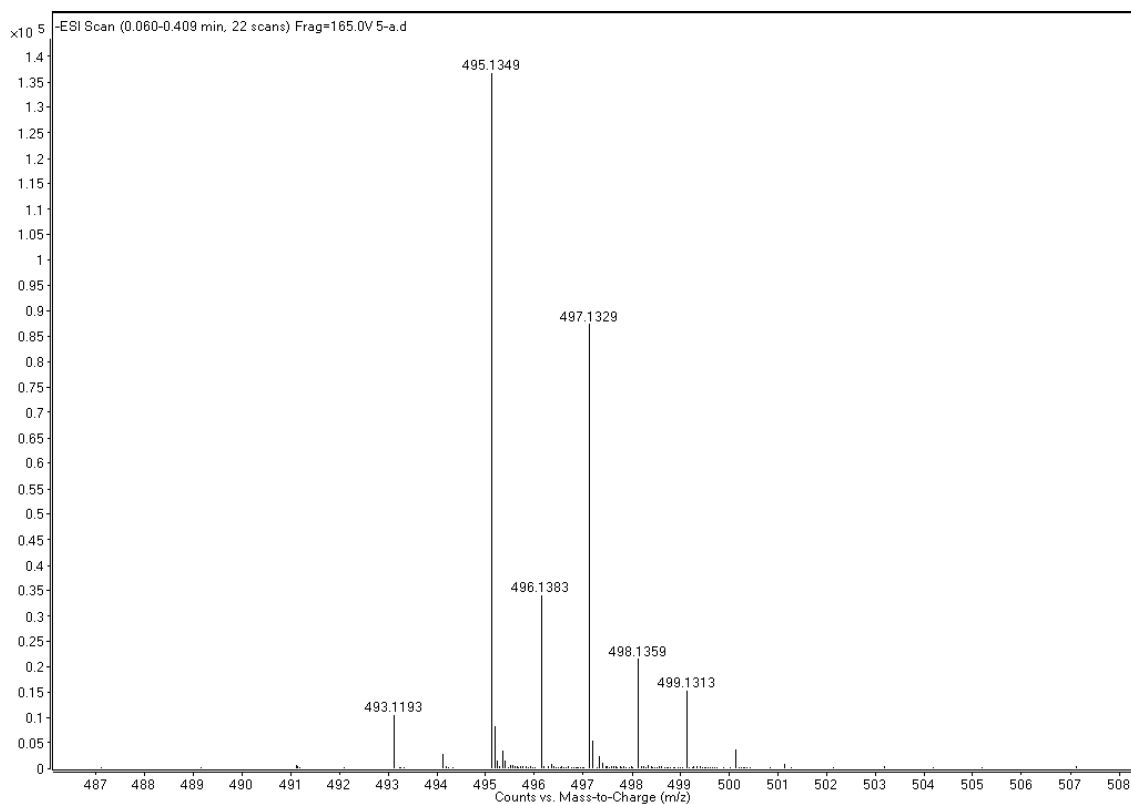
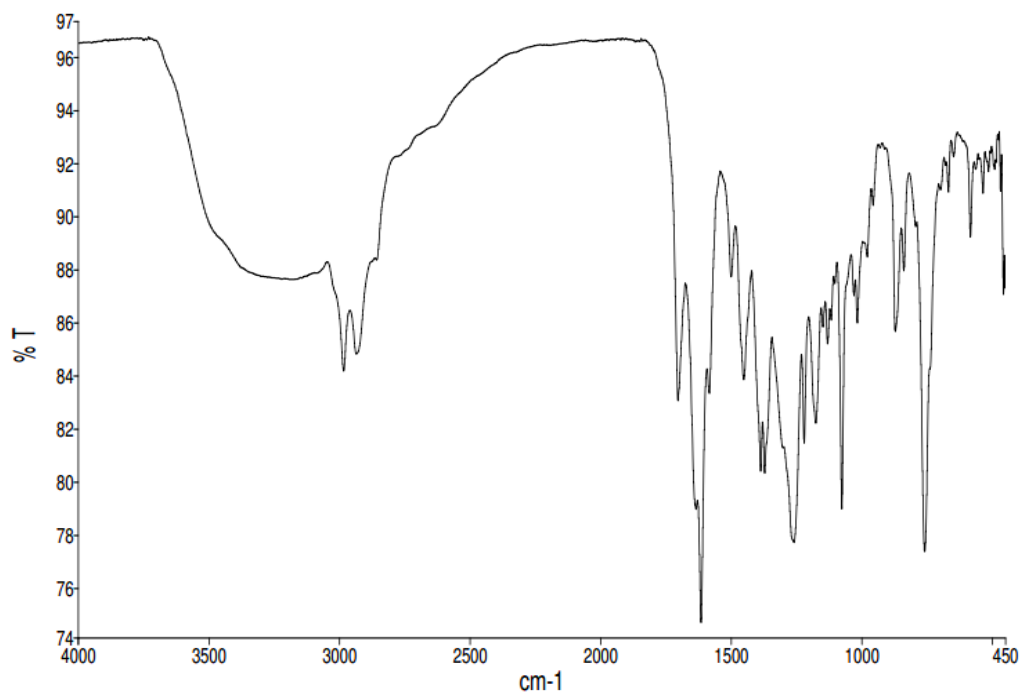


Figura vii-17 – Espectro de massa HR-ESI-MS do composto PTM-420-F2+F3-F20

Figura vii-18 – Espectro de IV do composto PTM-420-F2+F3-F20, em CDCl₃

4. ESPECTROS PTM-420-F2+F3-F35

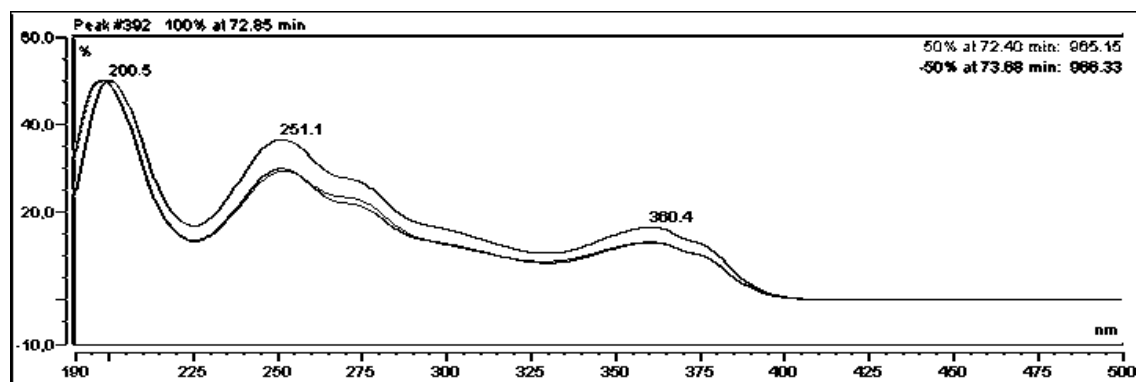
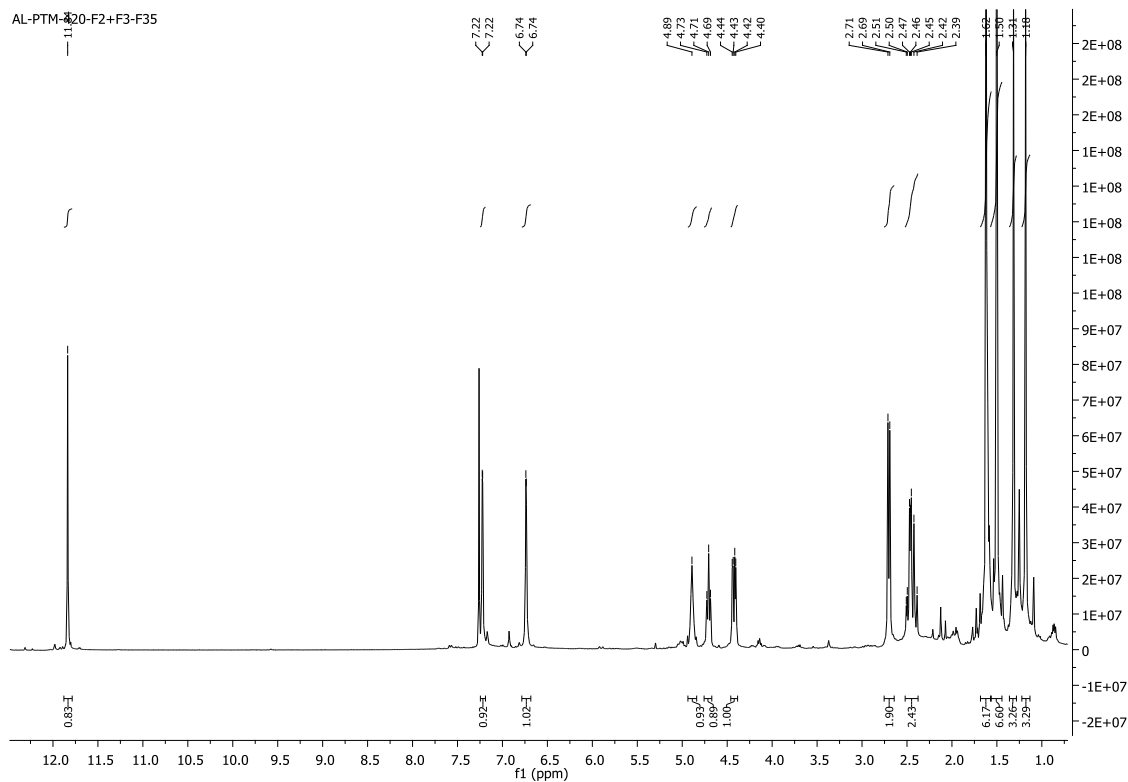


Figura vii-19 – Perfil UV do composto PTM-420-F2+F3-F35

Figura vii-20 - Espectro ^1H do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3

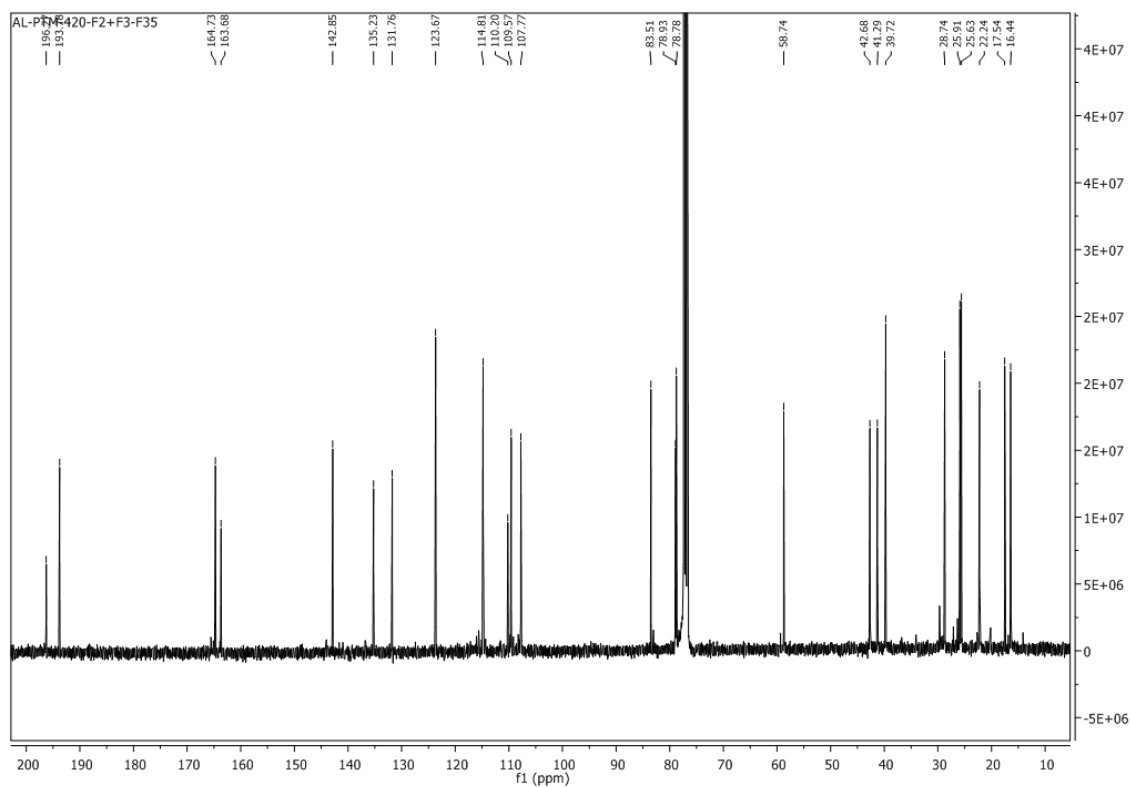


Figura vii-21 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3

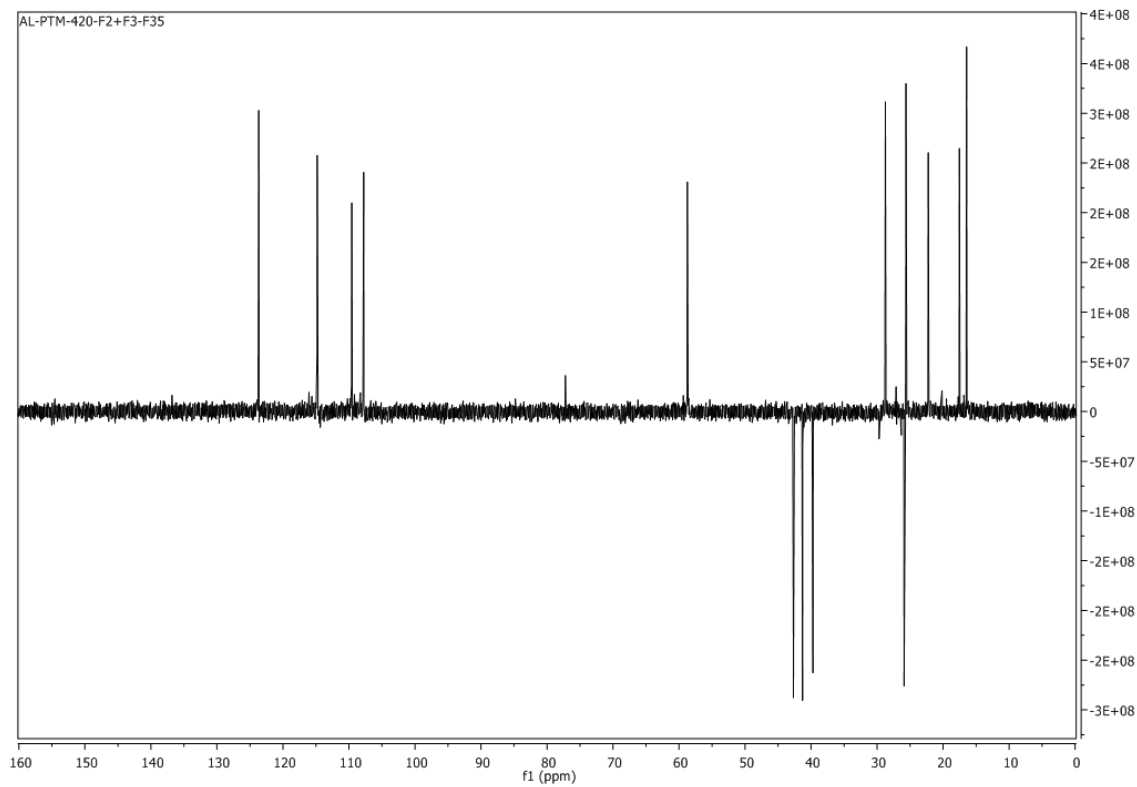


Figura vii-22 - Espectro ^{13}C DEPT 135 do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3

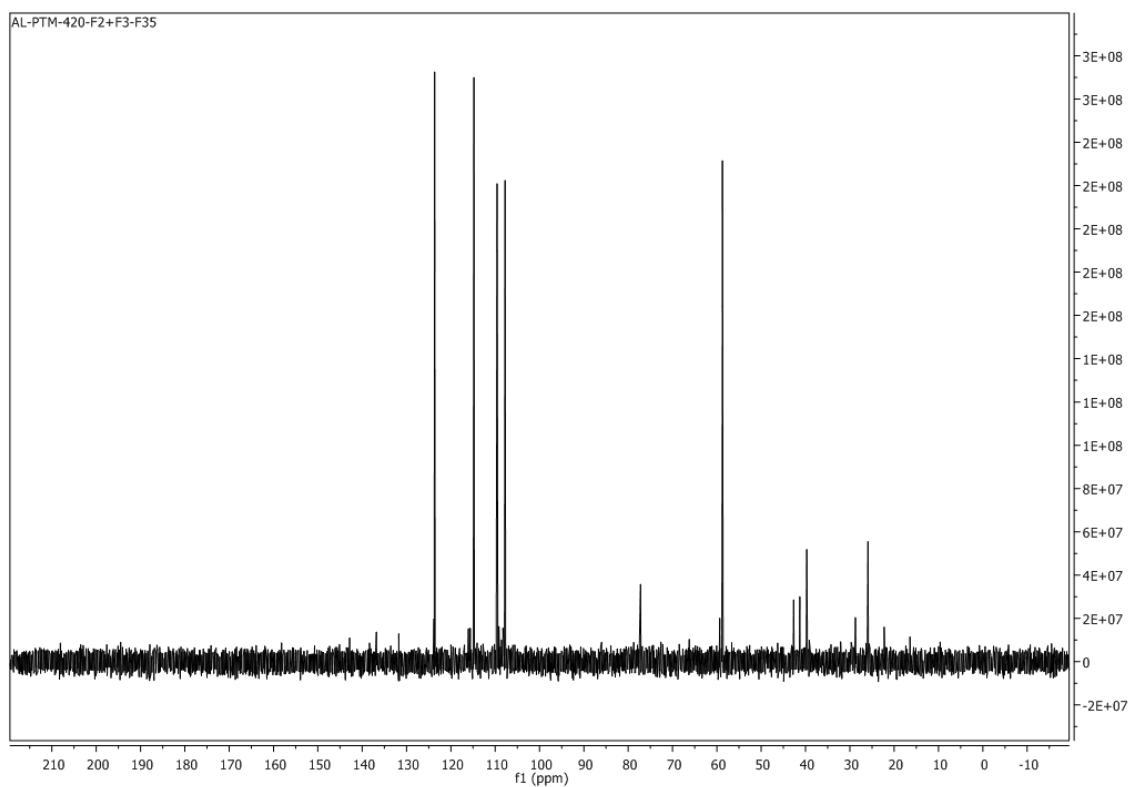


Figura vii-23 - Espectro ^{13}C DEPT 90 do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3

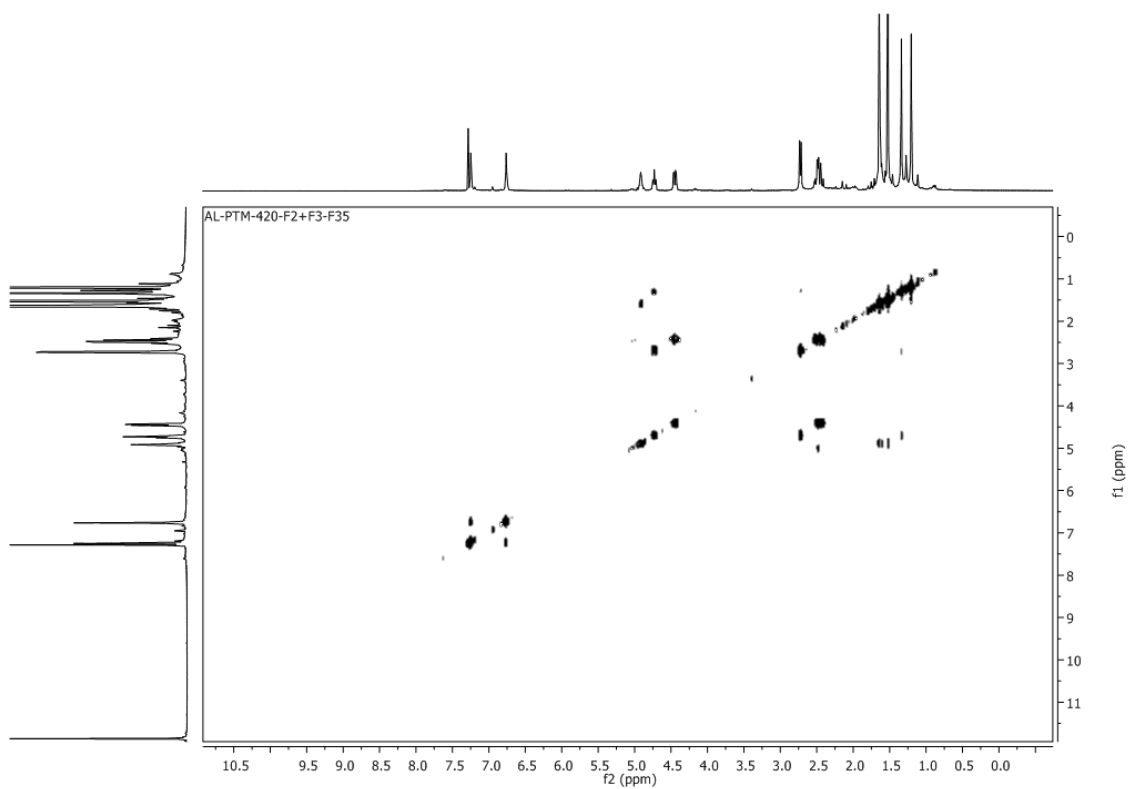
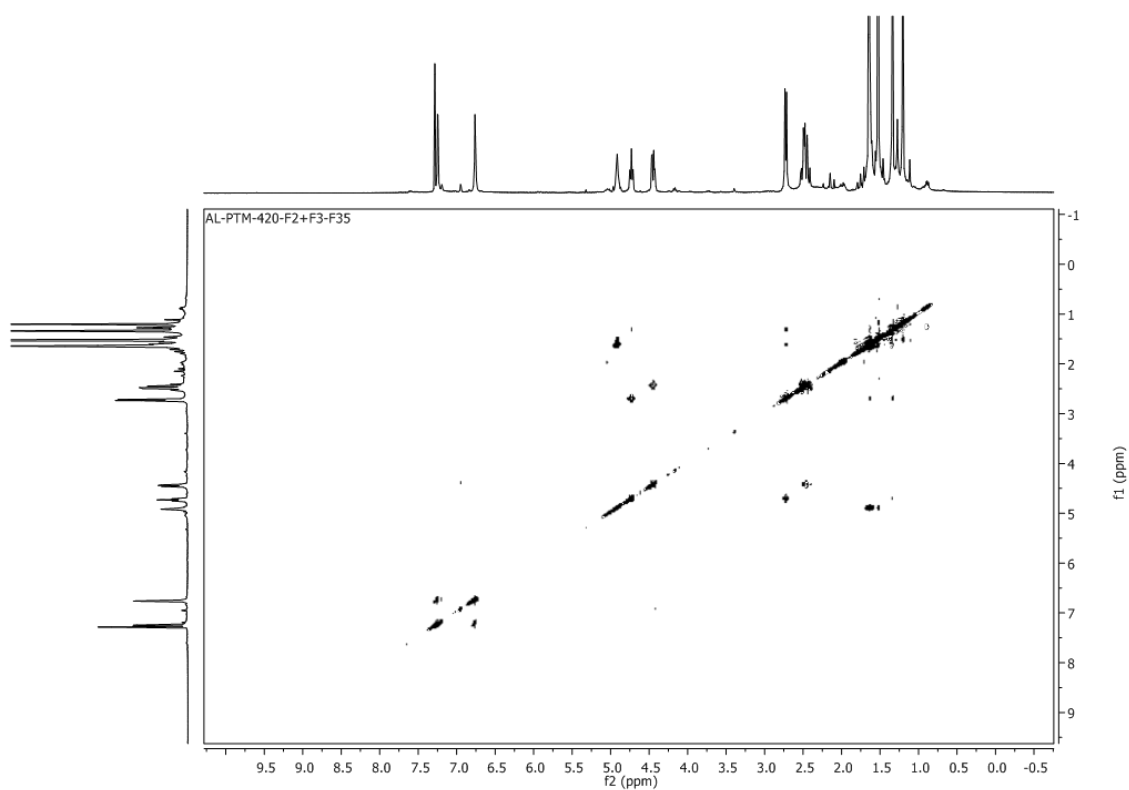
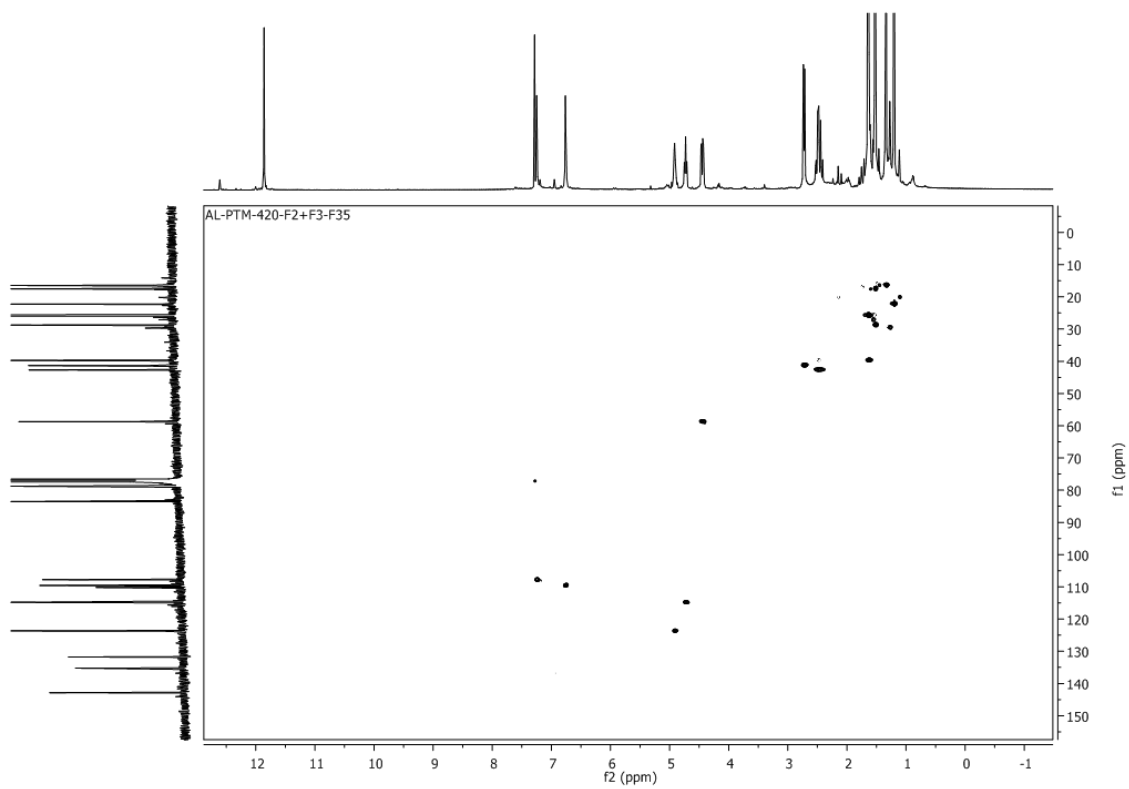
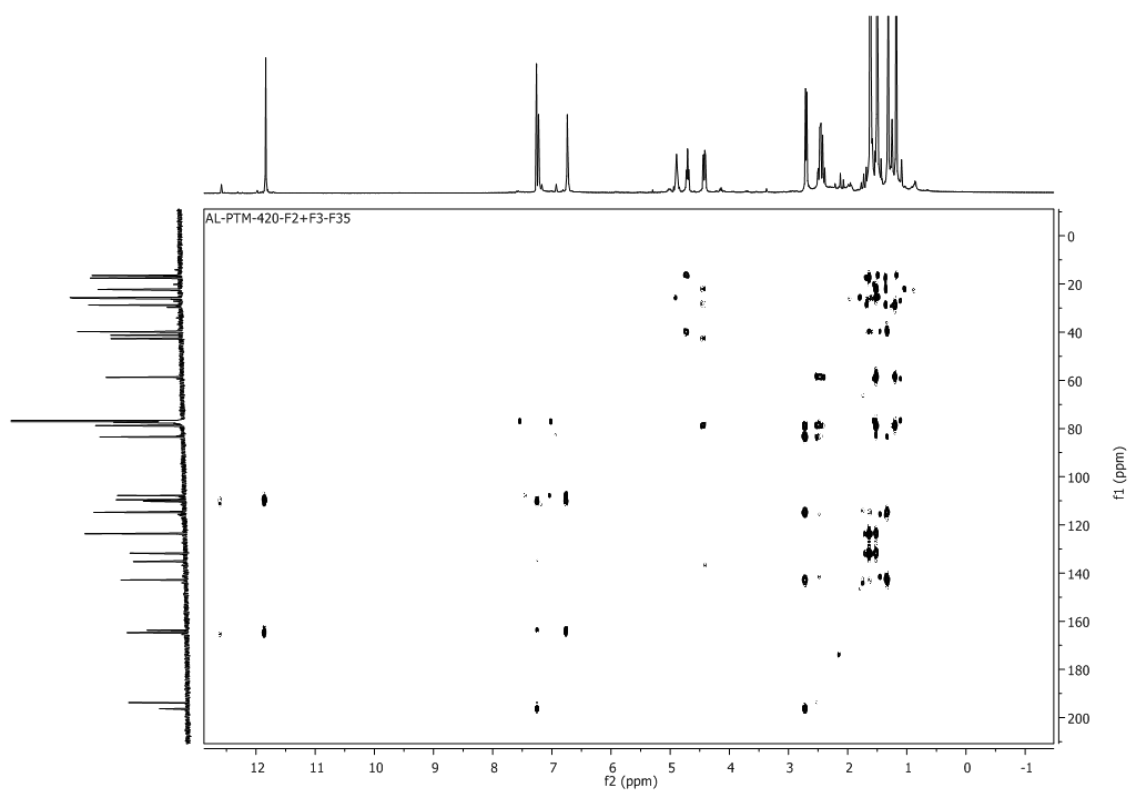
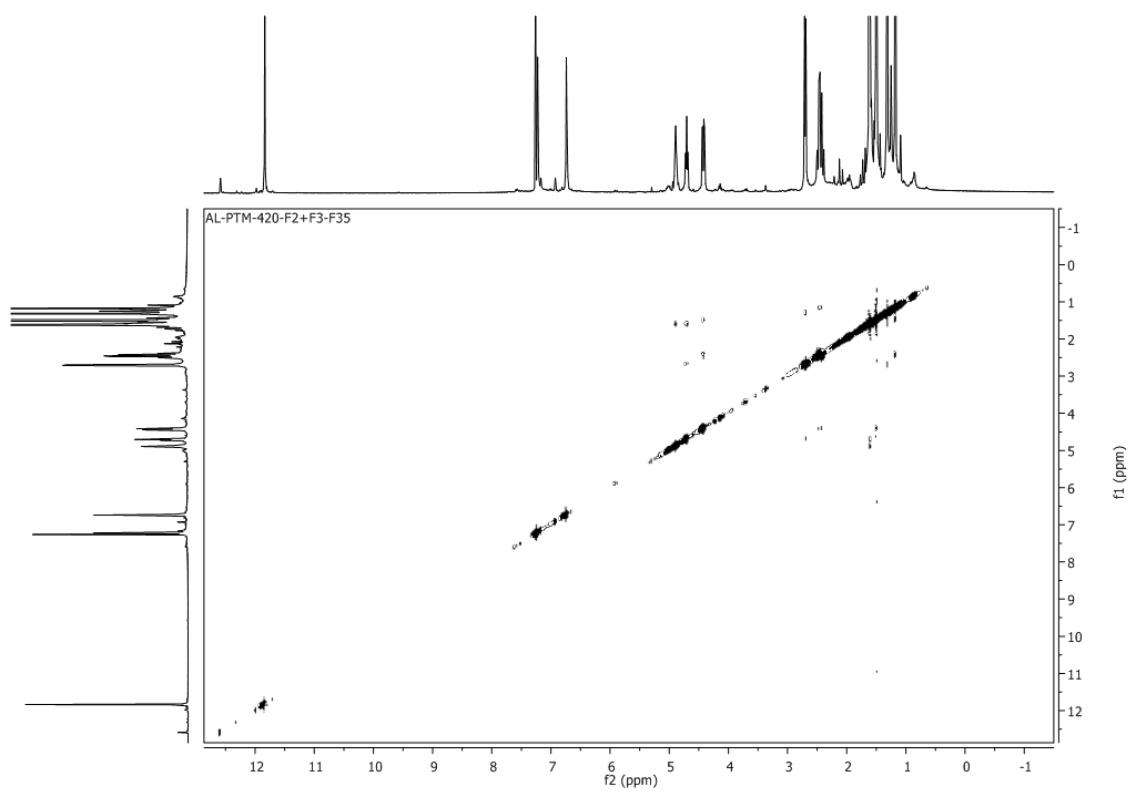


Figura vii-24 - Espectro COSY do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3

Figura vii-25 - Espectro TOCSY do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3 Figura vii-26 - Espectro HSQC do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3

Figura vii-27 - Espectro HMBC do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3 Figura vii-28 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F2+F3-F35, em CDCl_3

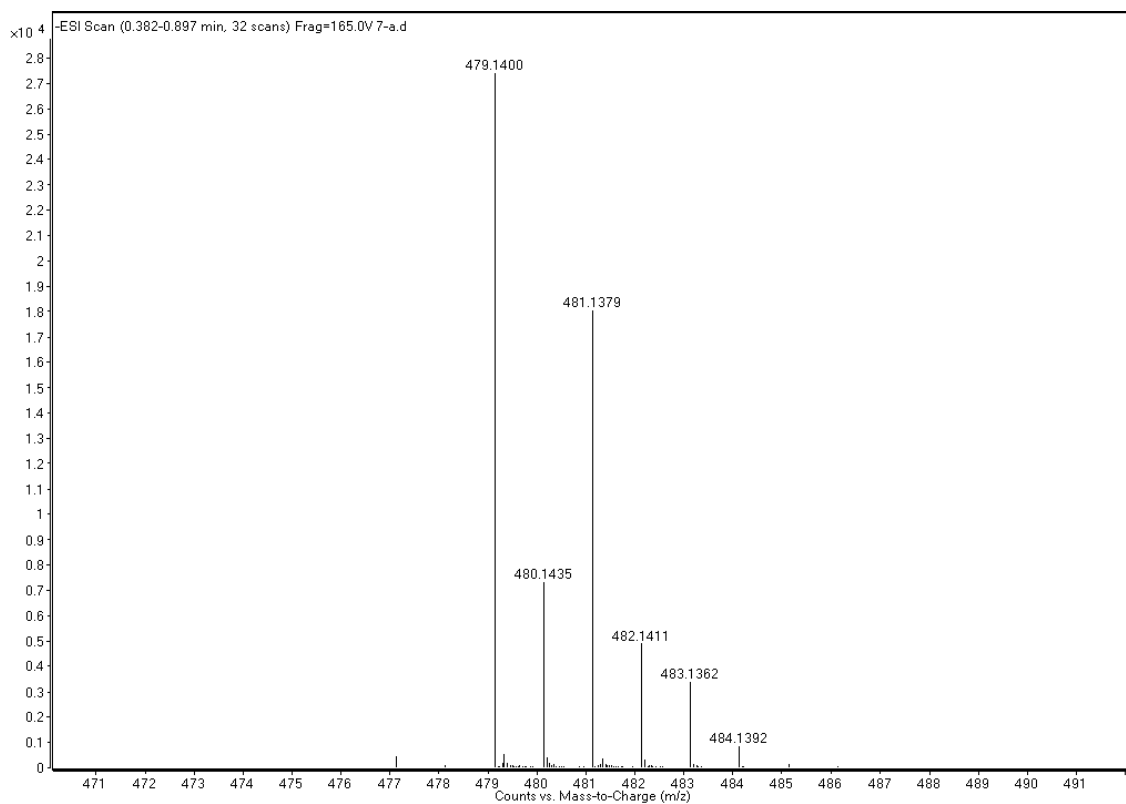
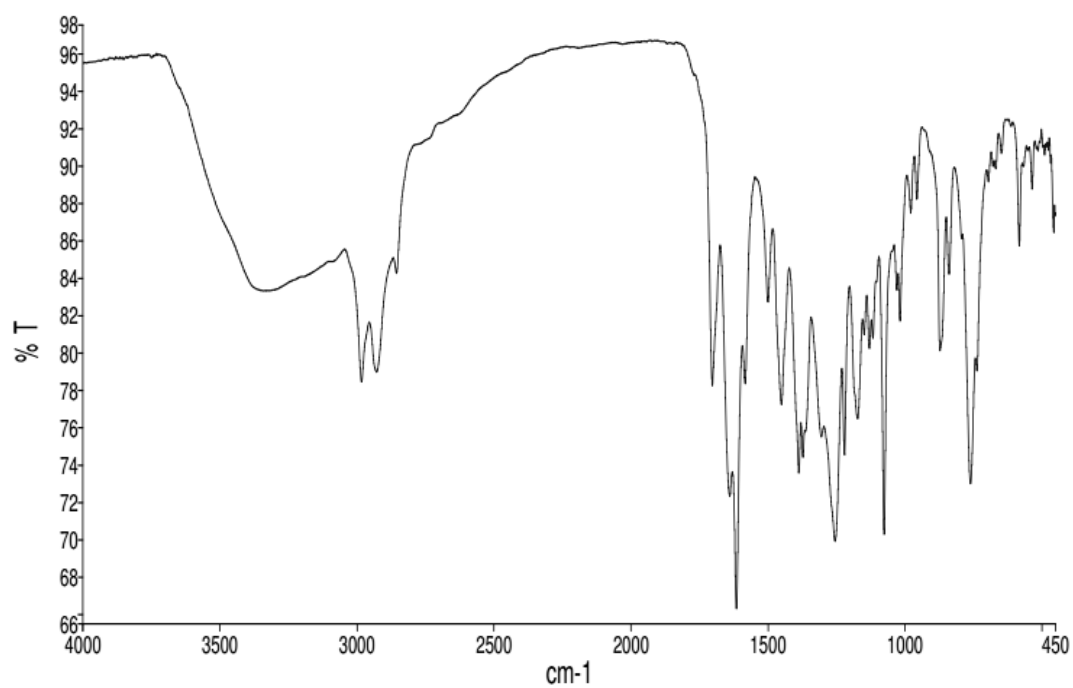


Figura vii-29 – Espectro de massa HR-ESI-MS do composto PTM-420-F2+F3-F35

Figura vii-30 – Espectro de IV do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl₃

5. ESPECTROS PTM-420-F2+F3-F22

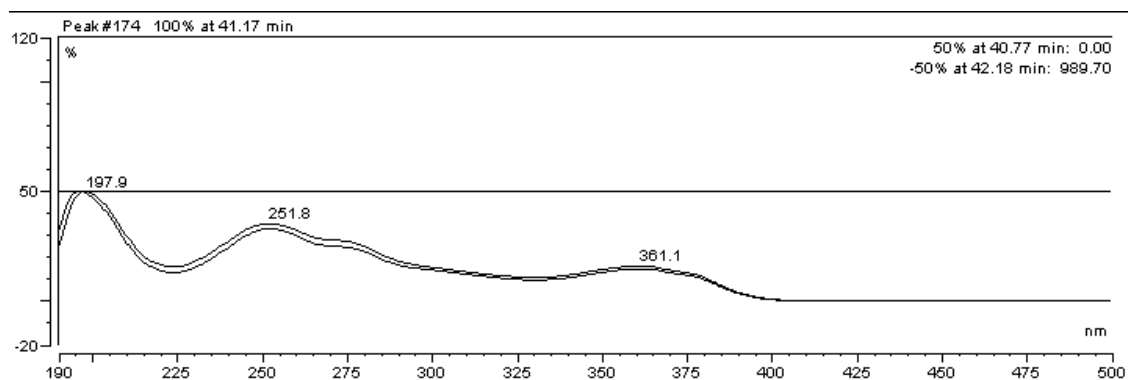


Figura vii-31 – Espectro UV do composto PTM-420-F2+F3-F22

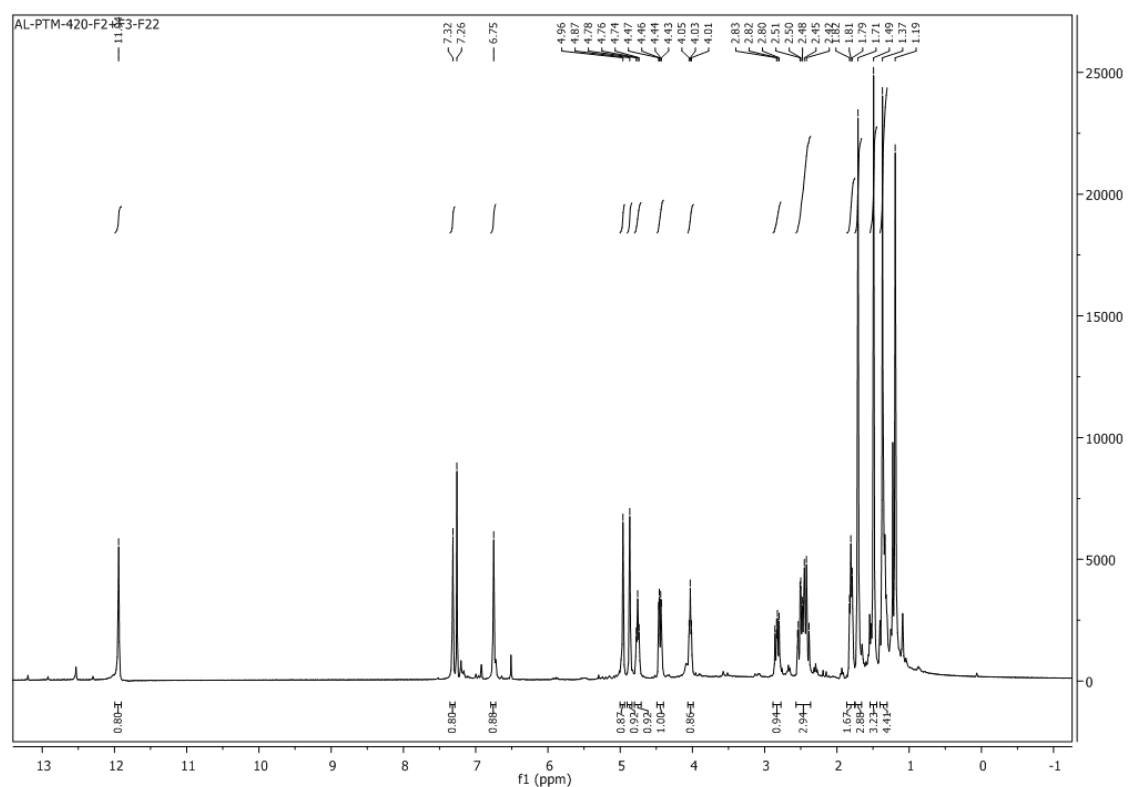


Figura vii-32 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3

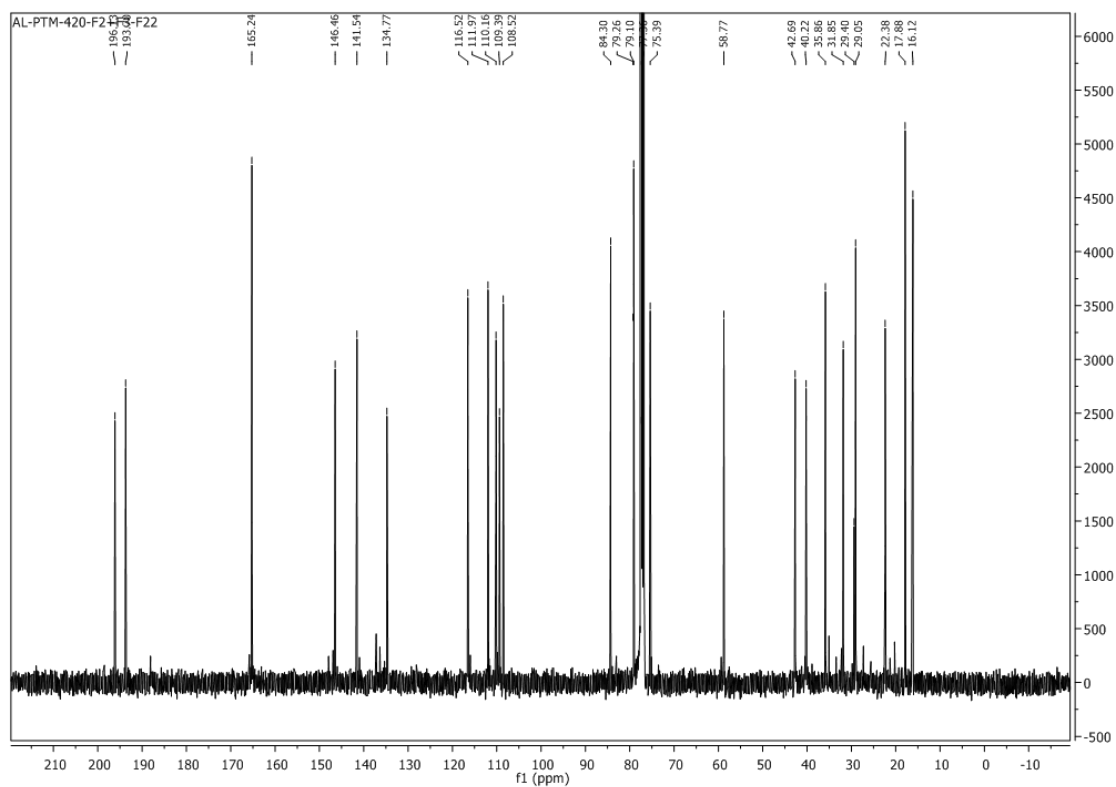


Figura vii-33 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3

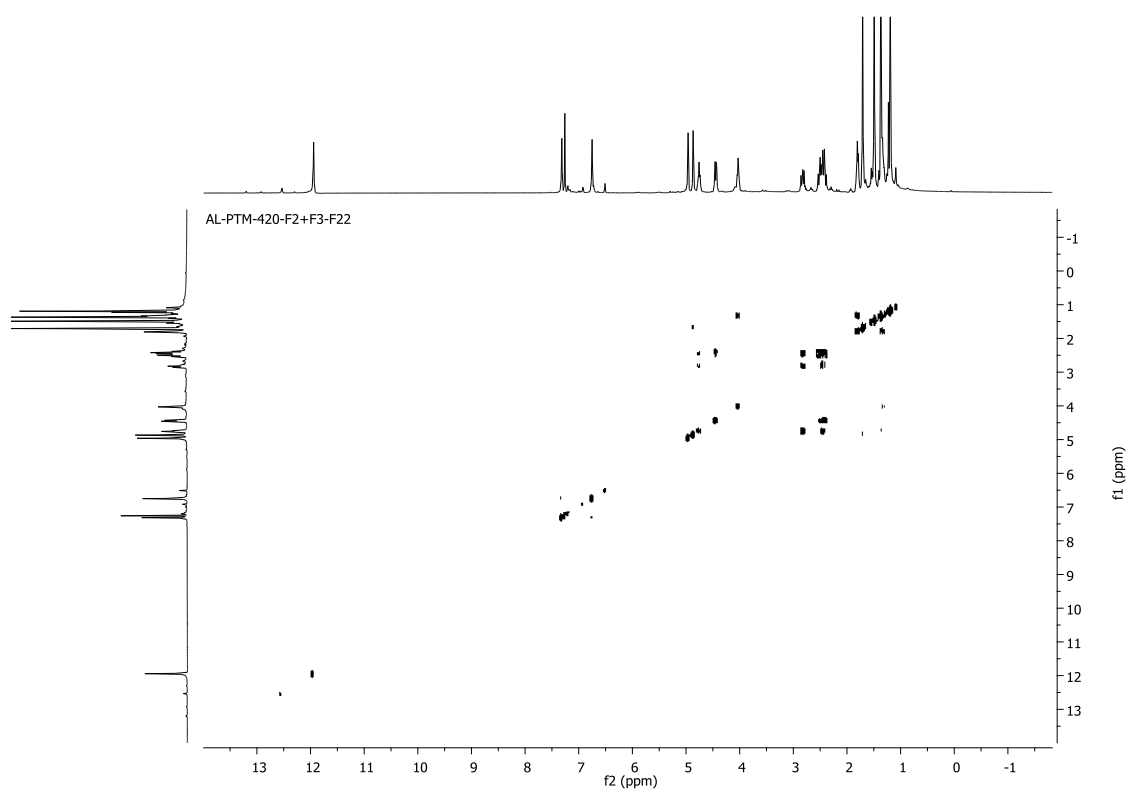


Figura vii-34 – Espectro COSY do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3

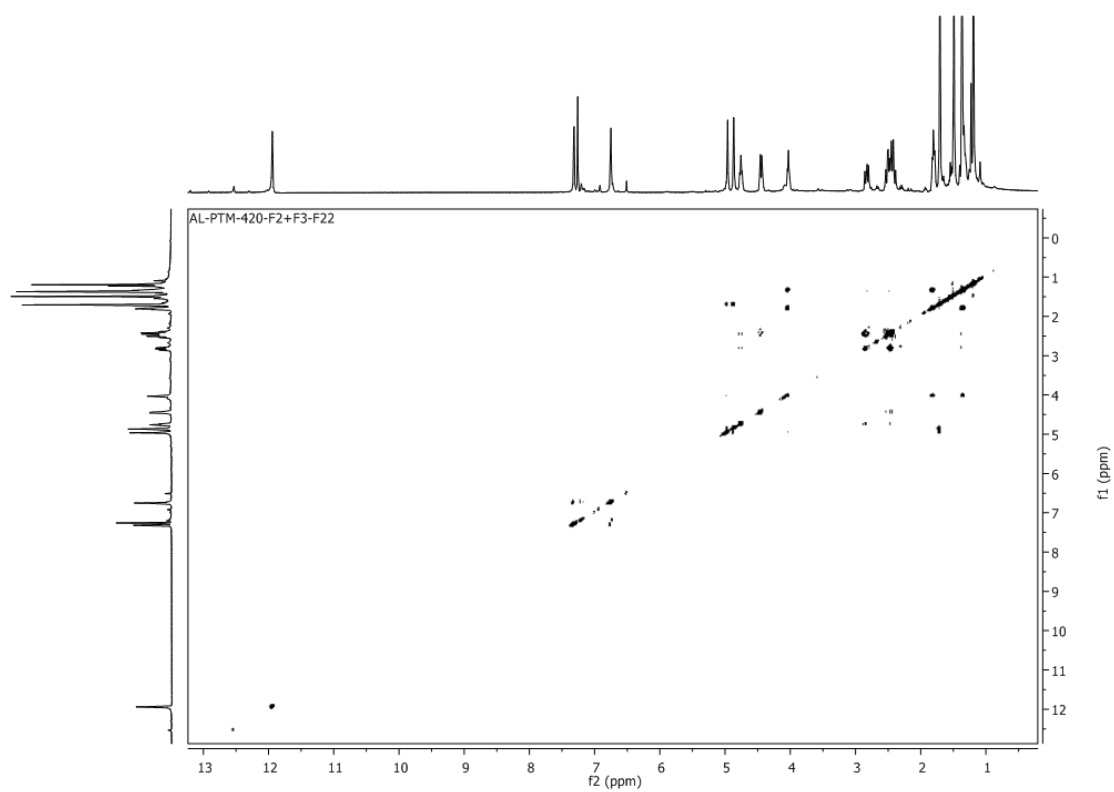


Figura vii-35 – Espectro TOCSY do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3

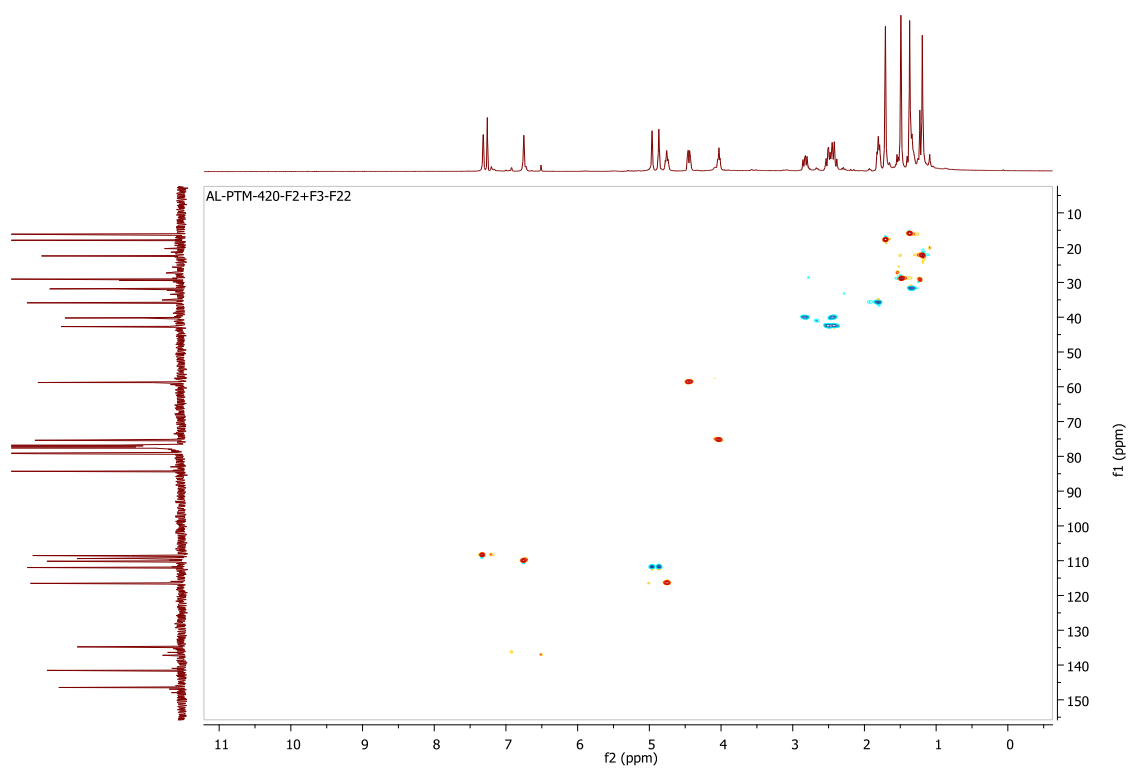


Figura vii-36 – Espectro HSQC-editado do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3

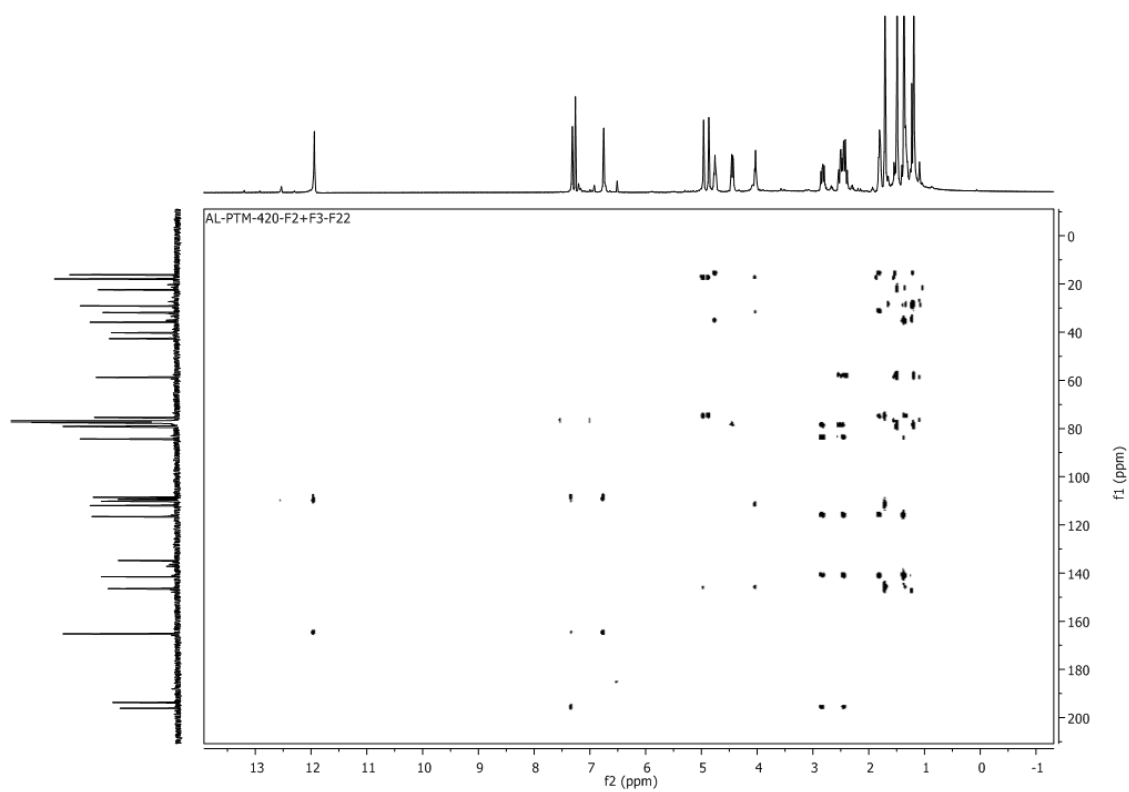


Figura vii-37 – Espectro HMBC do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3

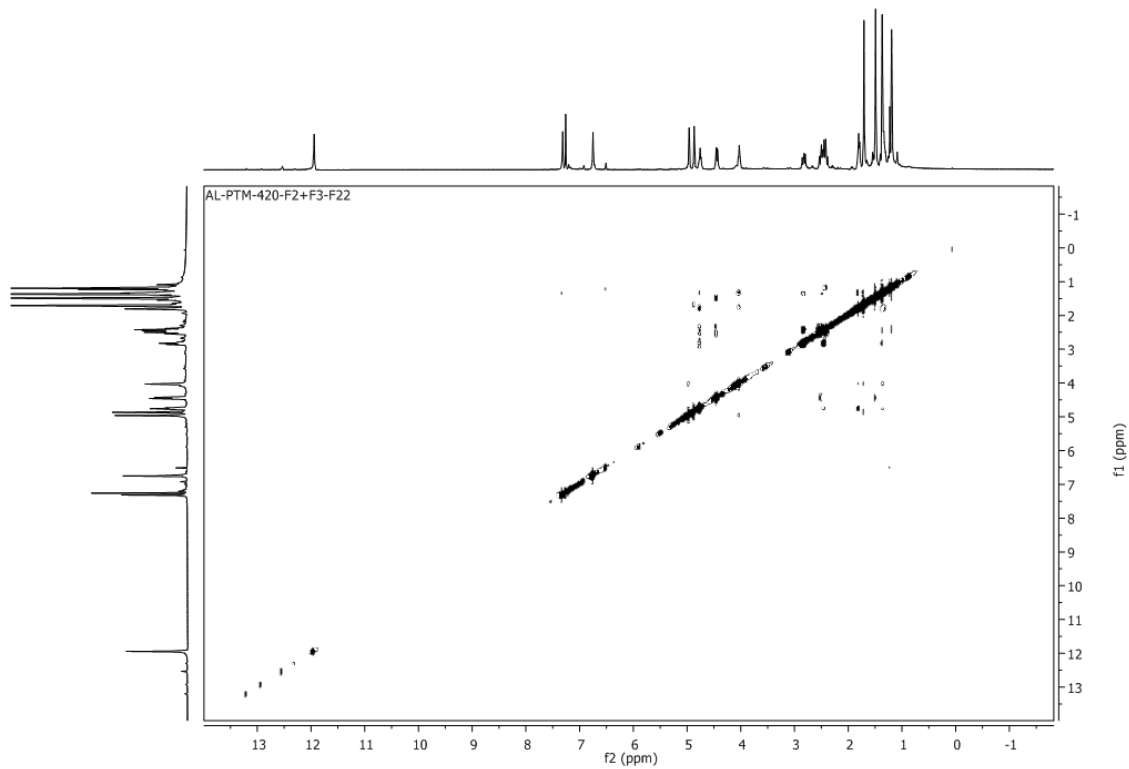


Figura vii-38 – Espectro NOESY do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CDCl_3

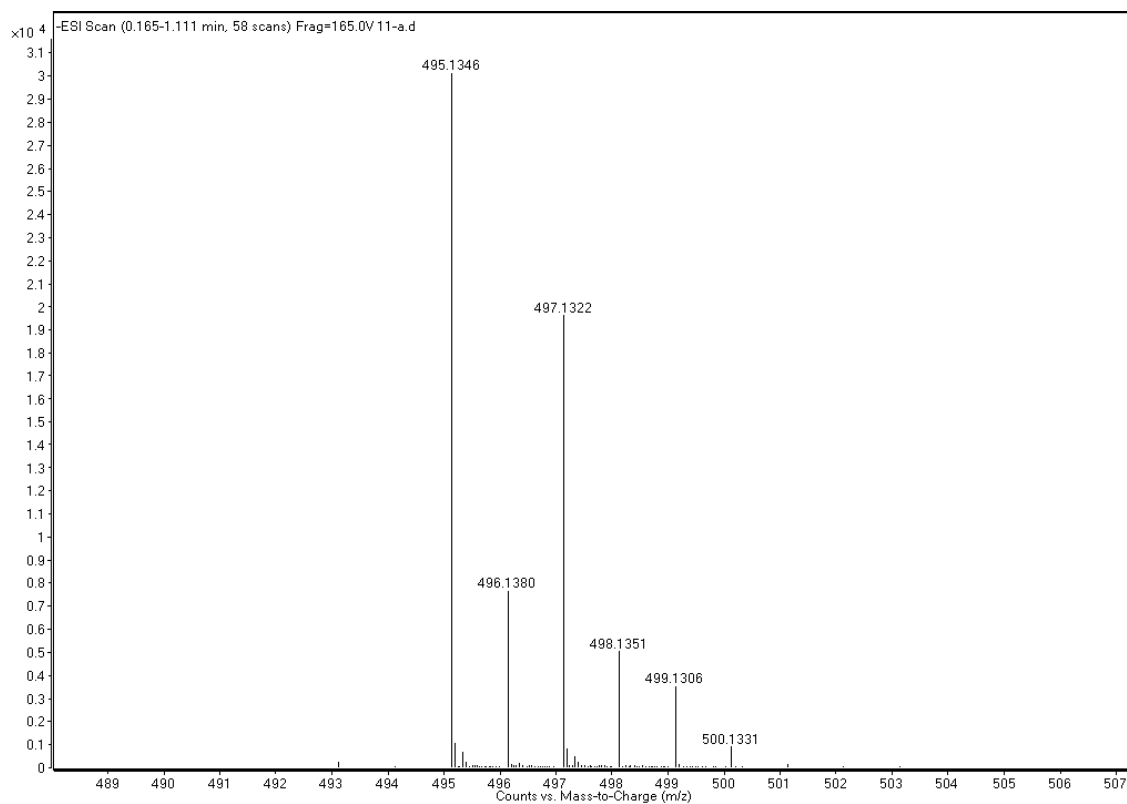
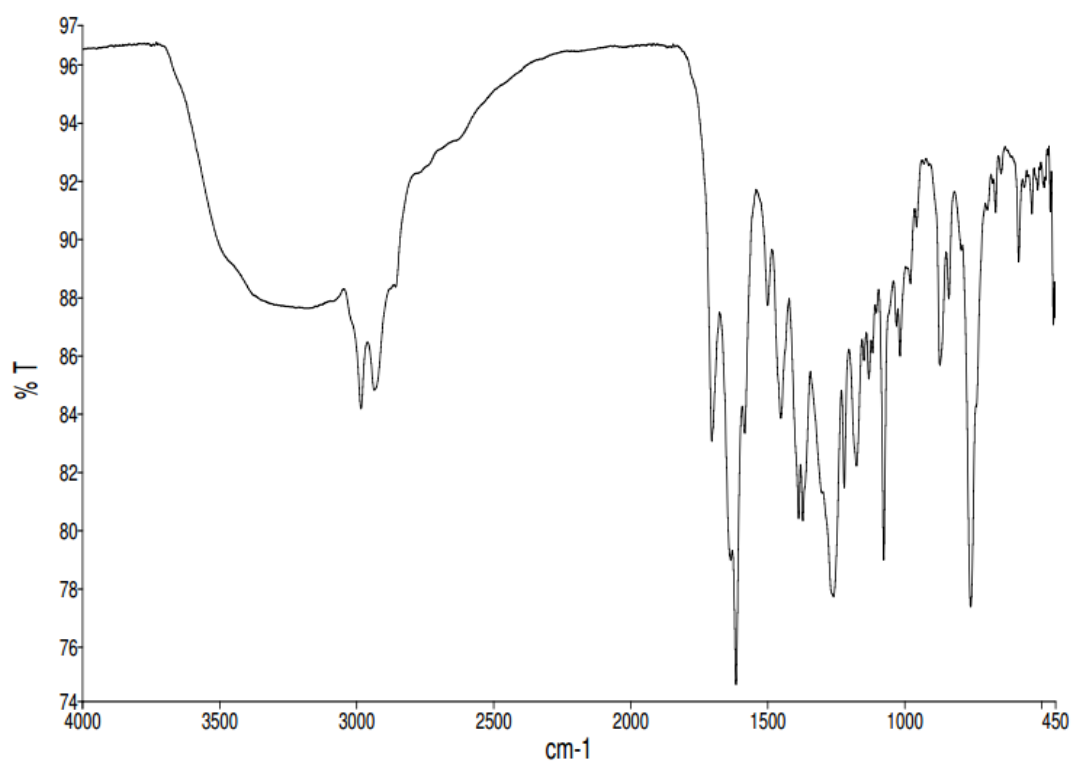


Figura vii-39 – Espectro de massa HR-ESI-MS do composto PTM-420-F2+F3-F22

Figura vii-40 – Espectro IV do composto PTM-420-F2+F3-F22, em CHCl_3

6. ESPECTROS PTM-420-F4-F25

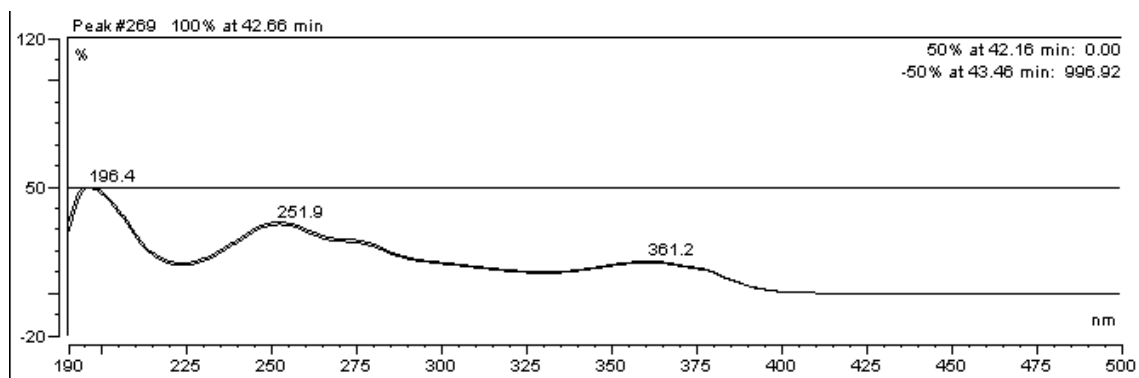


Figura vii-41 – Espectro UV do composto PTM-420-F4-F25

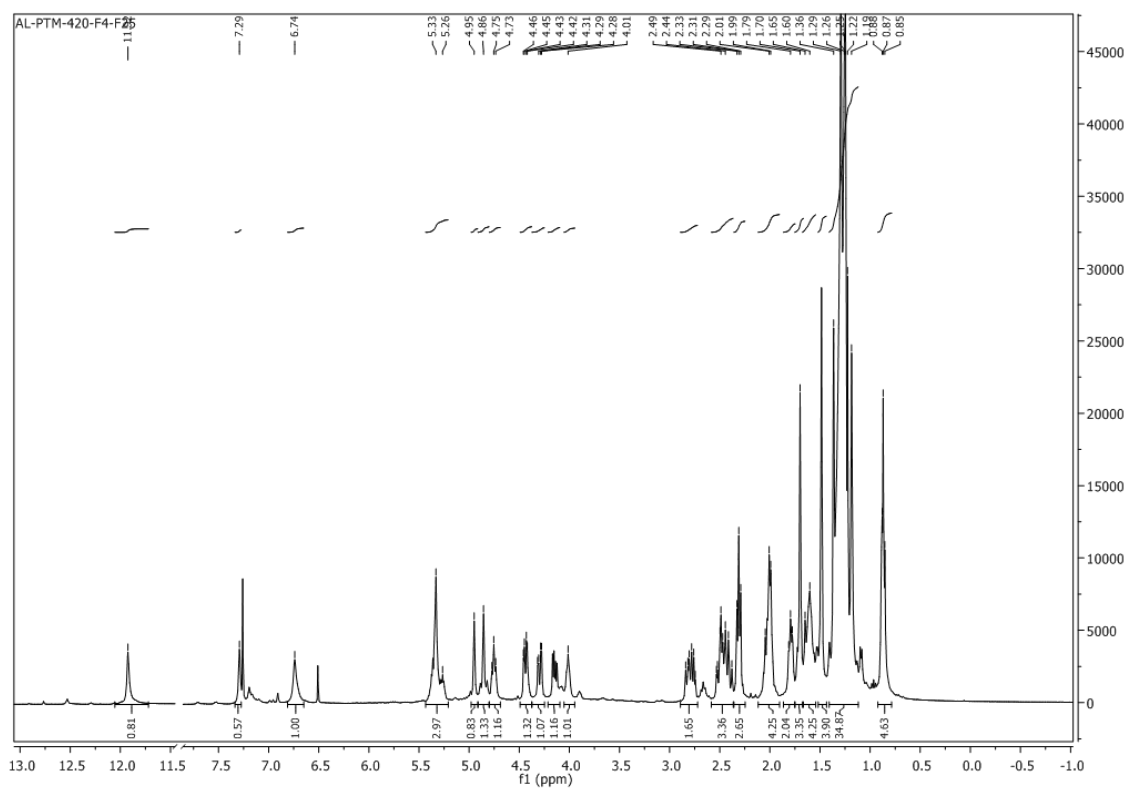


Figura vii-42 – Espectro ^1H para o composto PTM-420-F4-F25, em CDCl_3

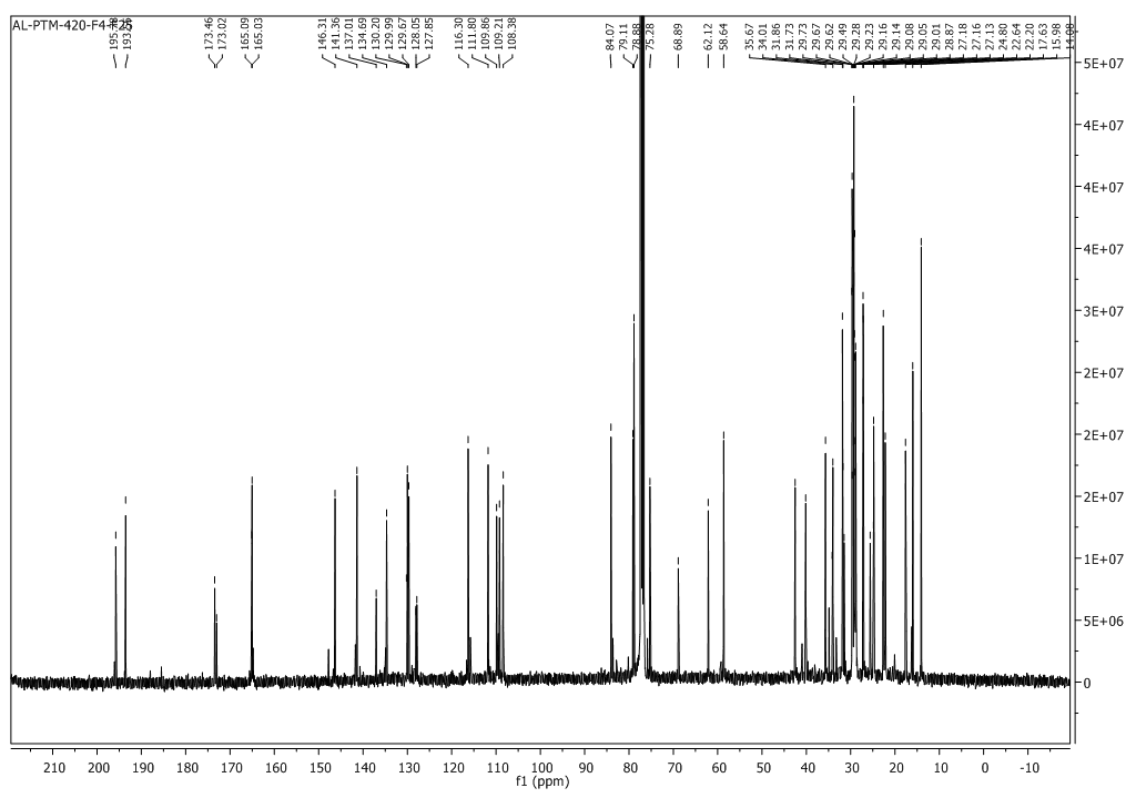


Figura vii-43 - Espectro ^{13}C para o composto PTM-420-F4-F25, em CDCl_3

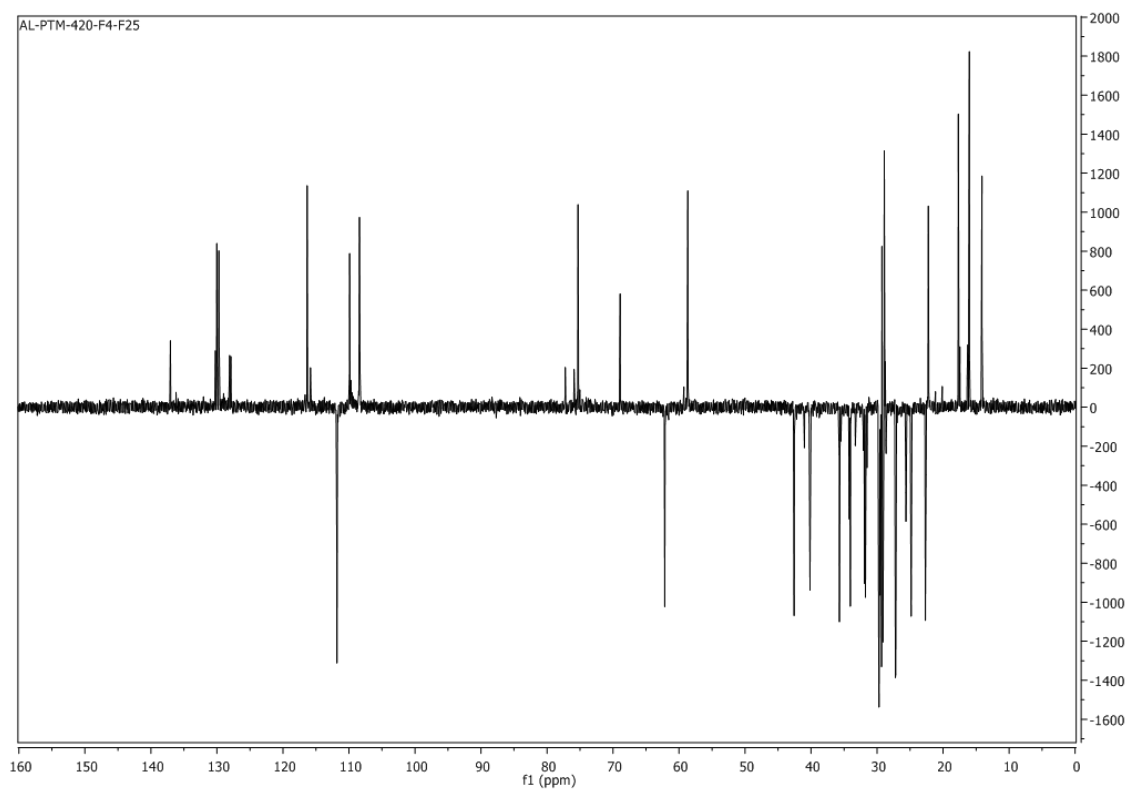


Figura vii-44 - Espectro ^{13}C DEPT 135 para o composto PTM-420-F4-F25, em CDCl_3

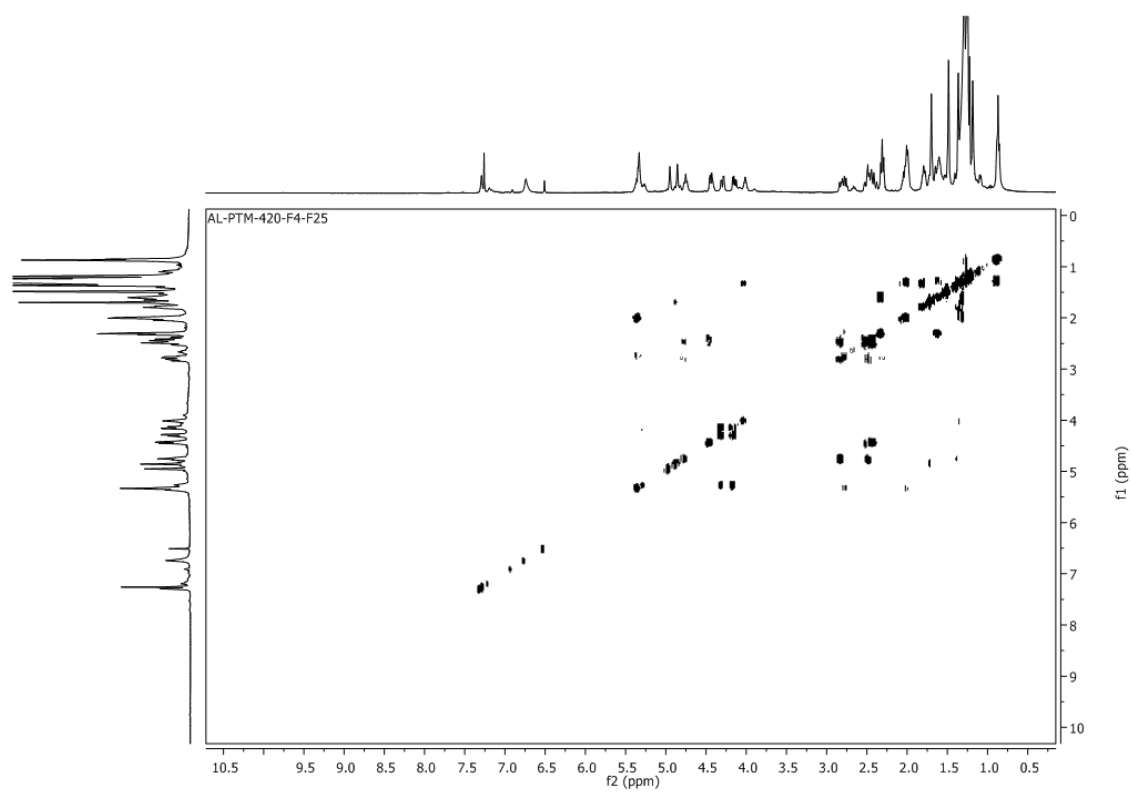


Figura vii-45 – Espectro COSY do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl_3

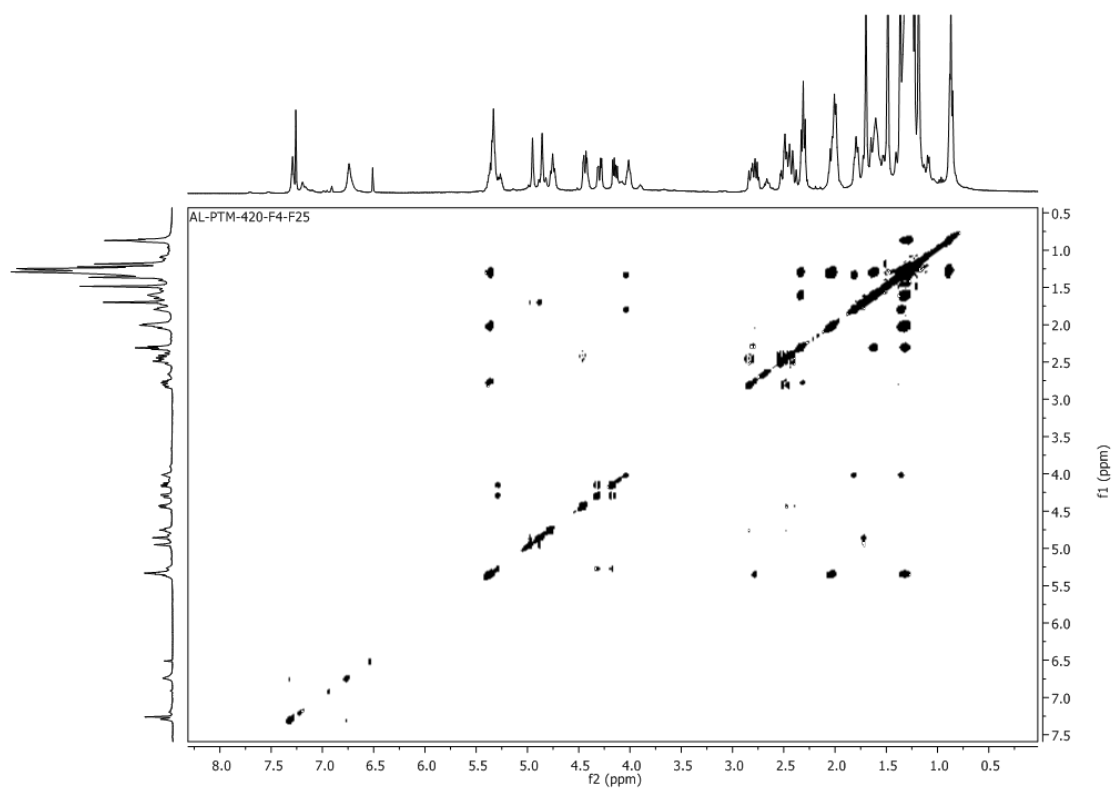
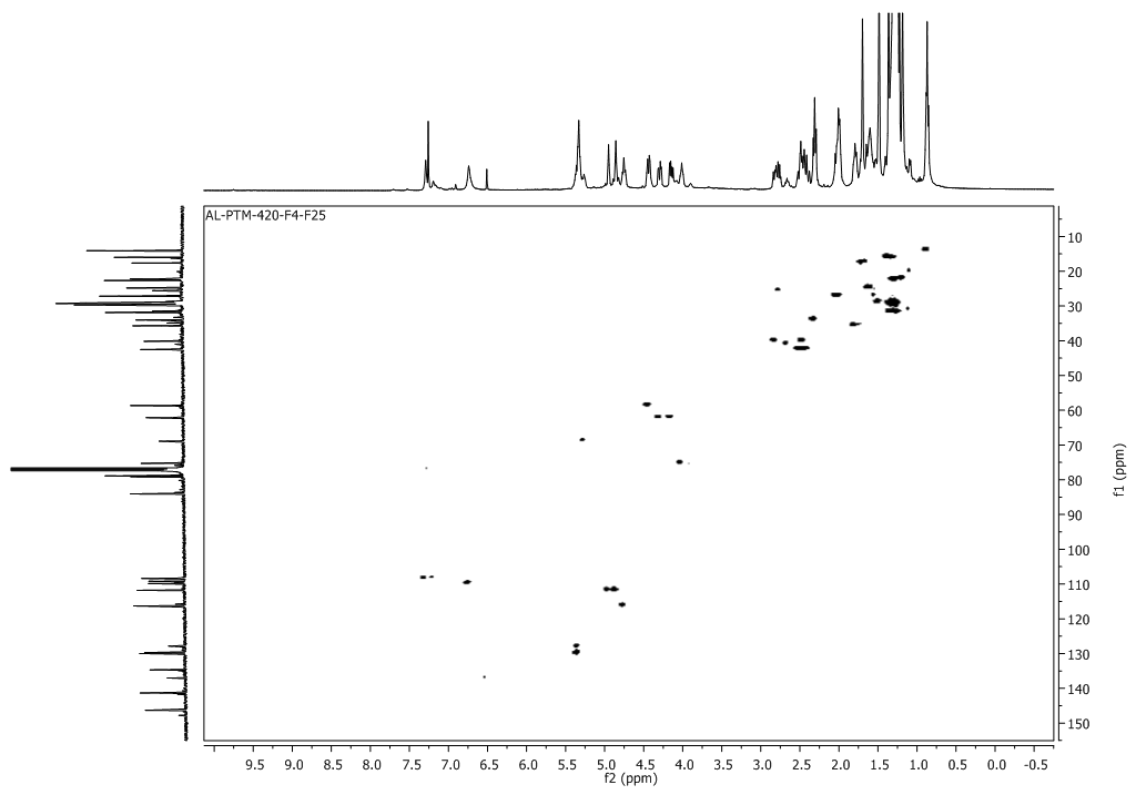
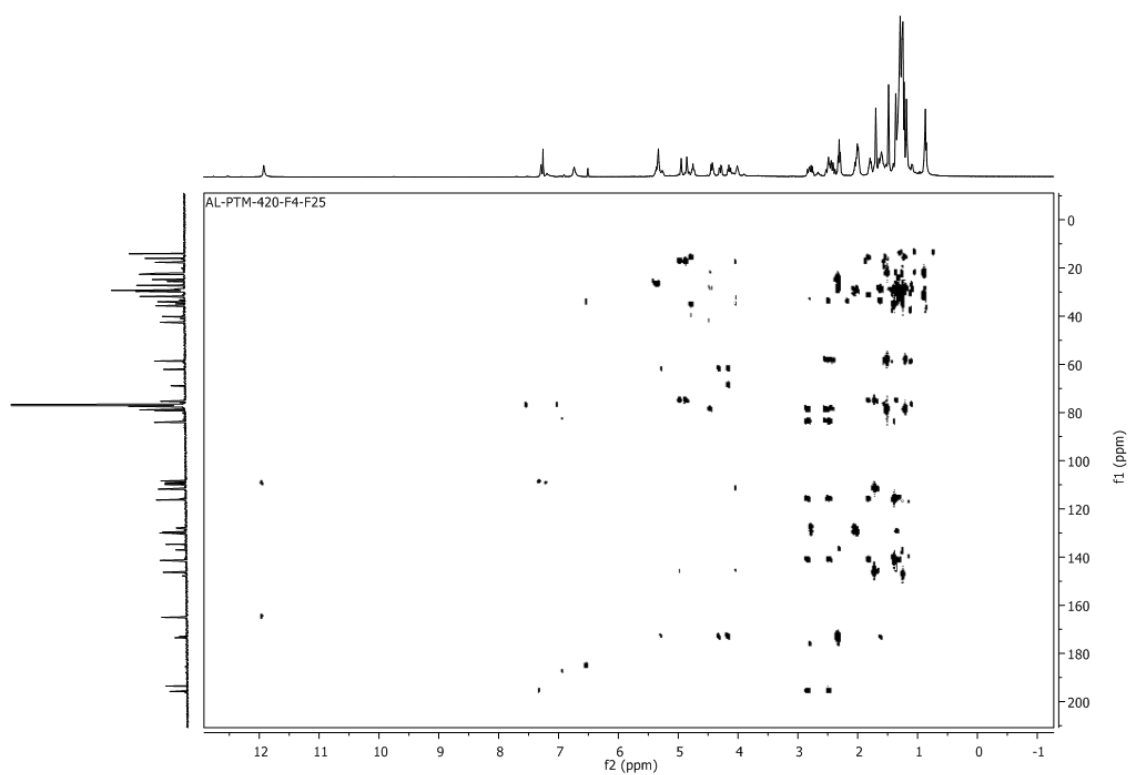


Figura vii-46 – Espectro TOCSY do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl_3

Figura vii-47 - Espectro HSQC do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl_3 Figura vii-48 - Espectro HMBC do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl_3

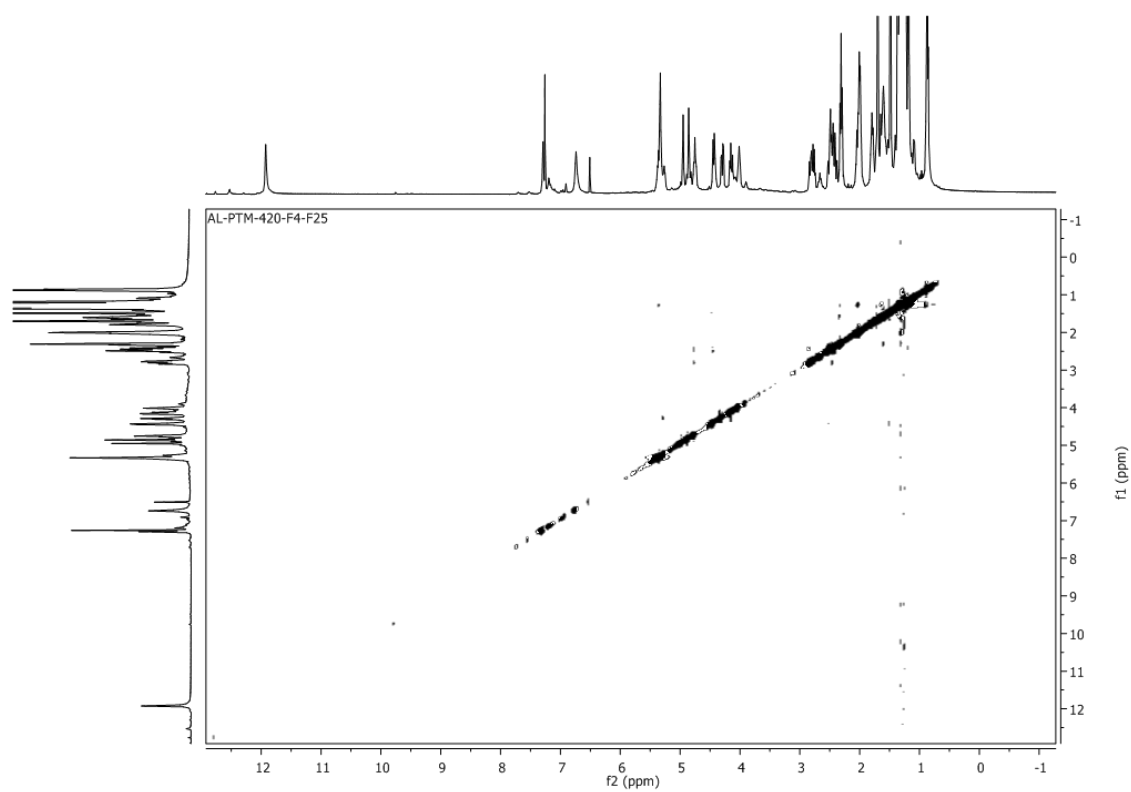


Figura vii-49 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F2+F3-F25, em CDCl_3

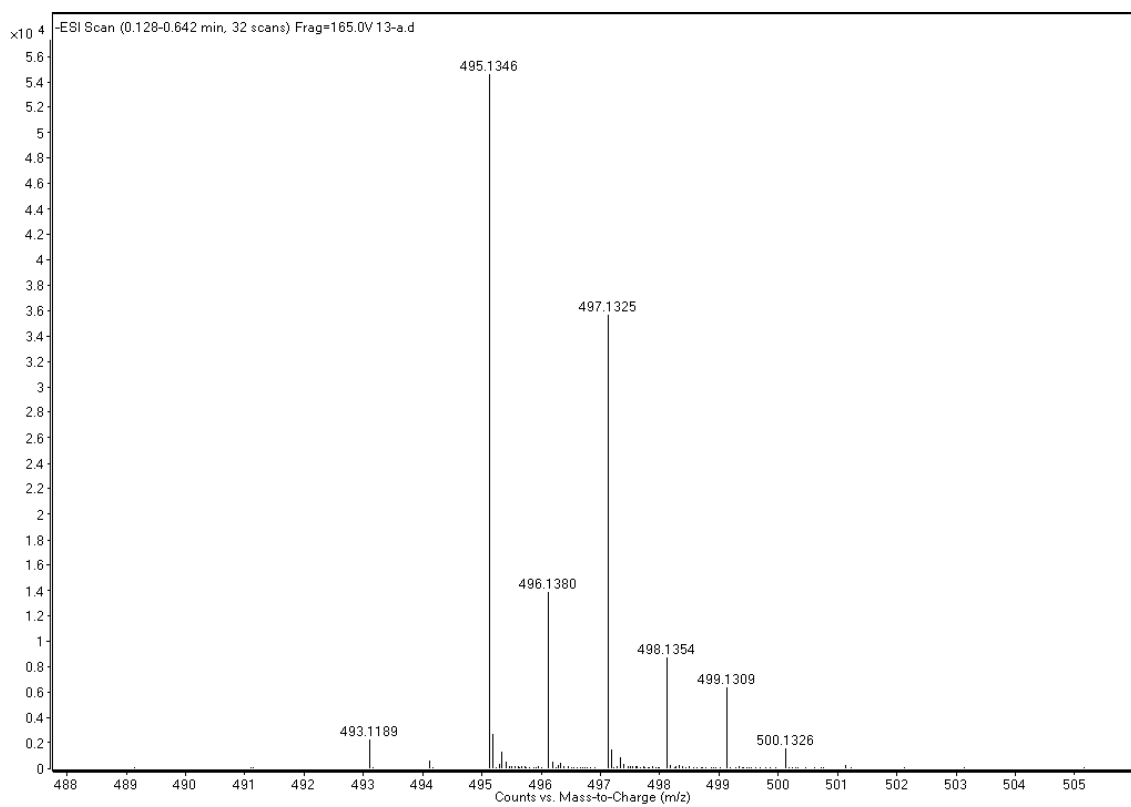


Figura vii-50 – Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-2+F3-F25

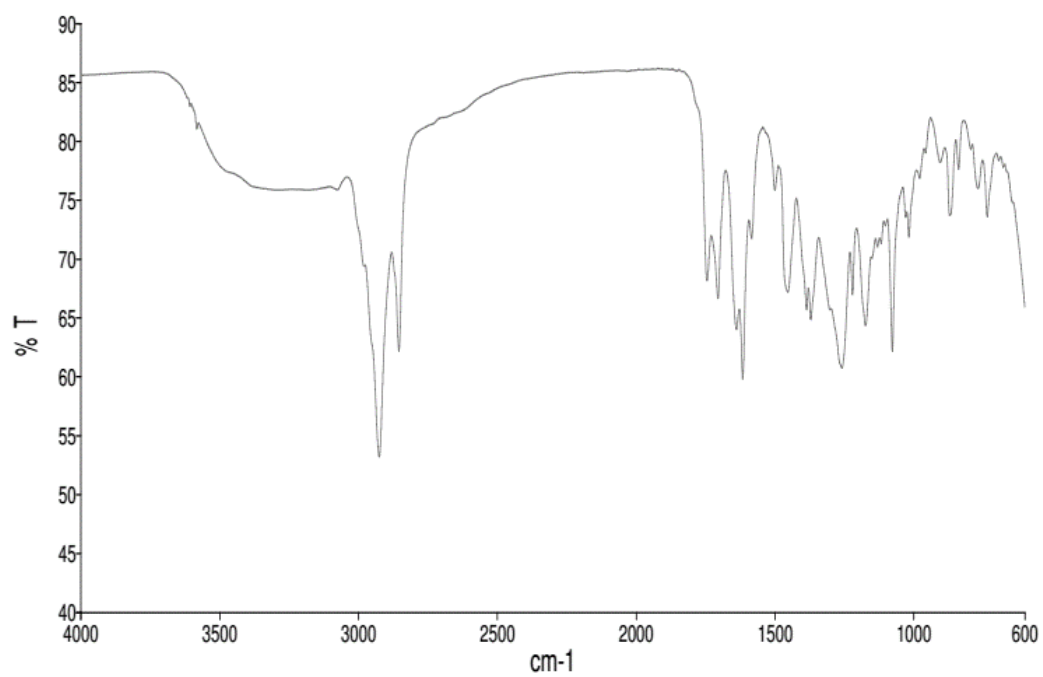


Figura vii-51 – Espectro IV do composto PTM-420-2+F3-F25, em CHCl_3

7. ESPECTROS PTM-420-F2+F3-F39

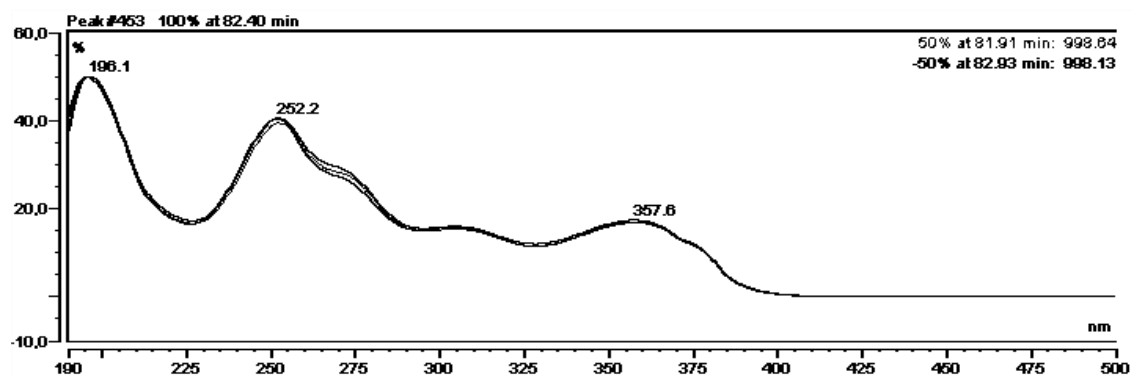
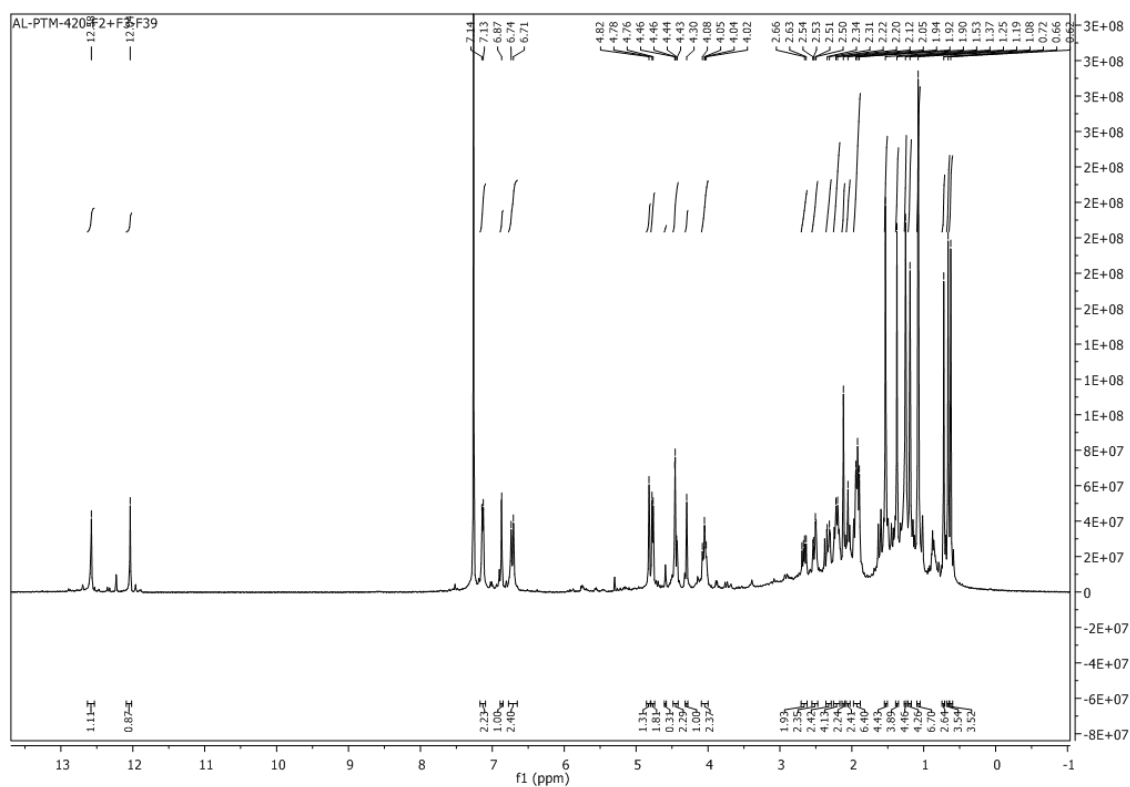


Figura vii-52 – Perfil UV do composto PTM-420-F2+F3-F39

Figura vii-53 - Espectro ^1H do composto PTM-420-F2+F3-F39, em CHCl_3

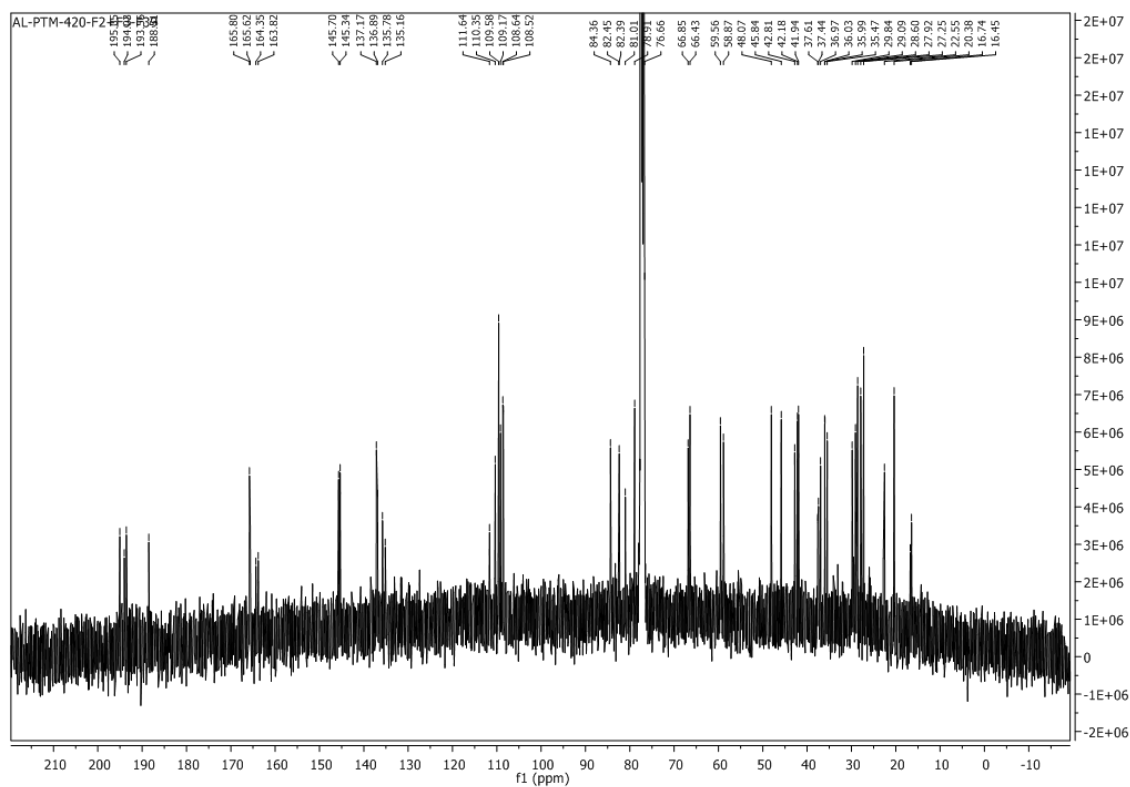


Figura vii-54 - - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F2+F3-F39, em CHCl_3

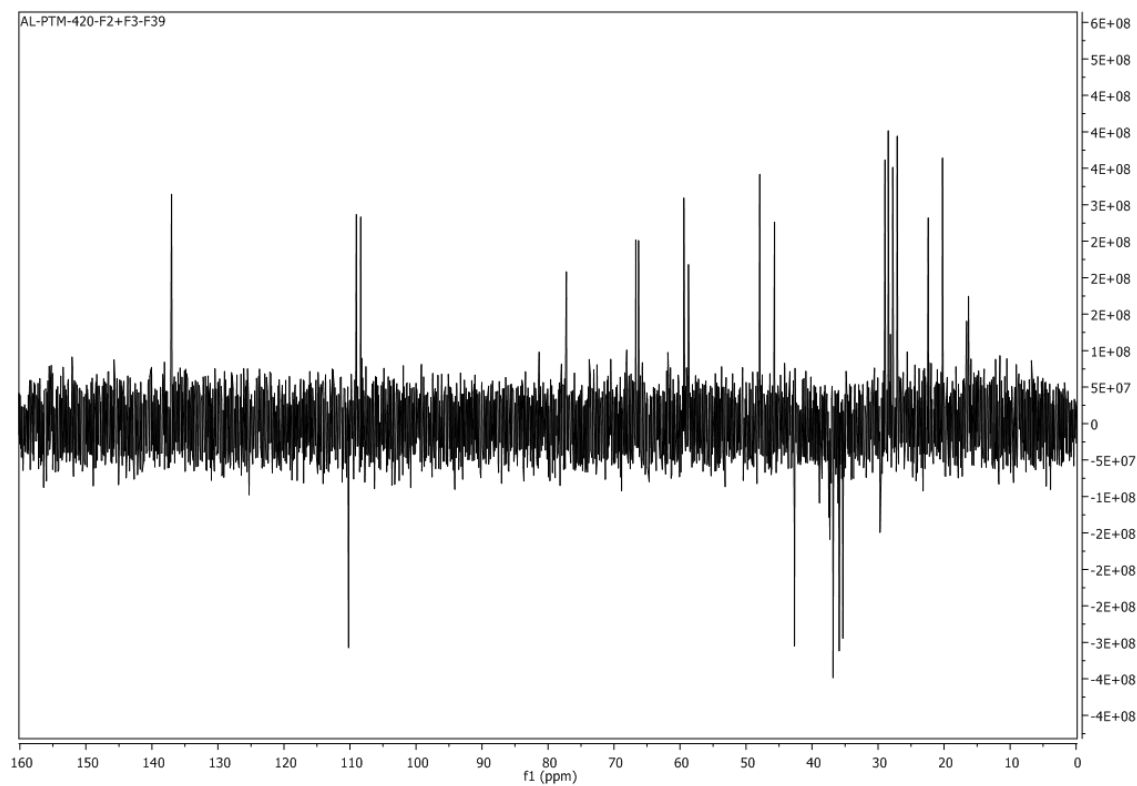


Figura vii-55 - Espectro ^{13}C DEPT 135 para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl_3

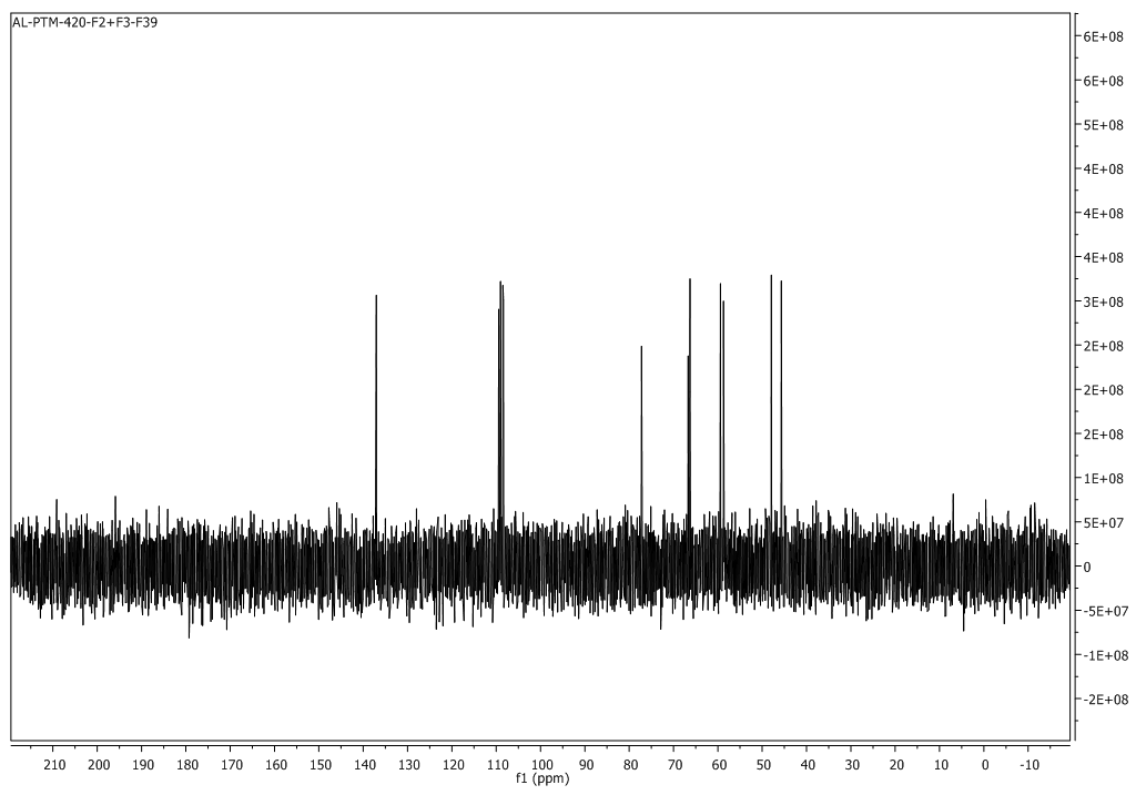


Figura vii-56 - Espectro ^{13}C DEPT 90 para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl_3

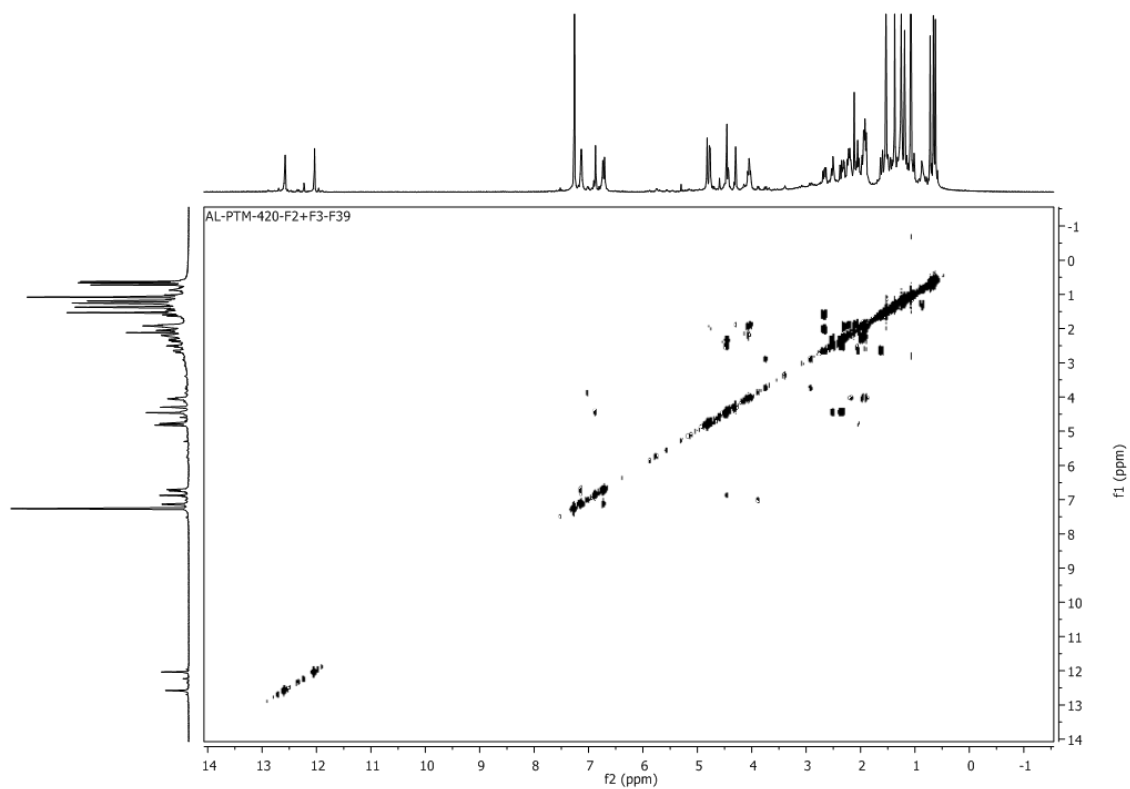


Figura vii-57 - Espectro COSY para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl_3

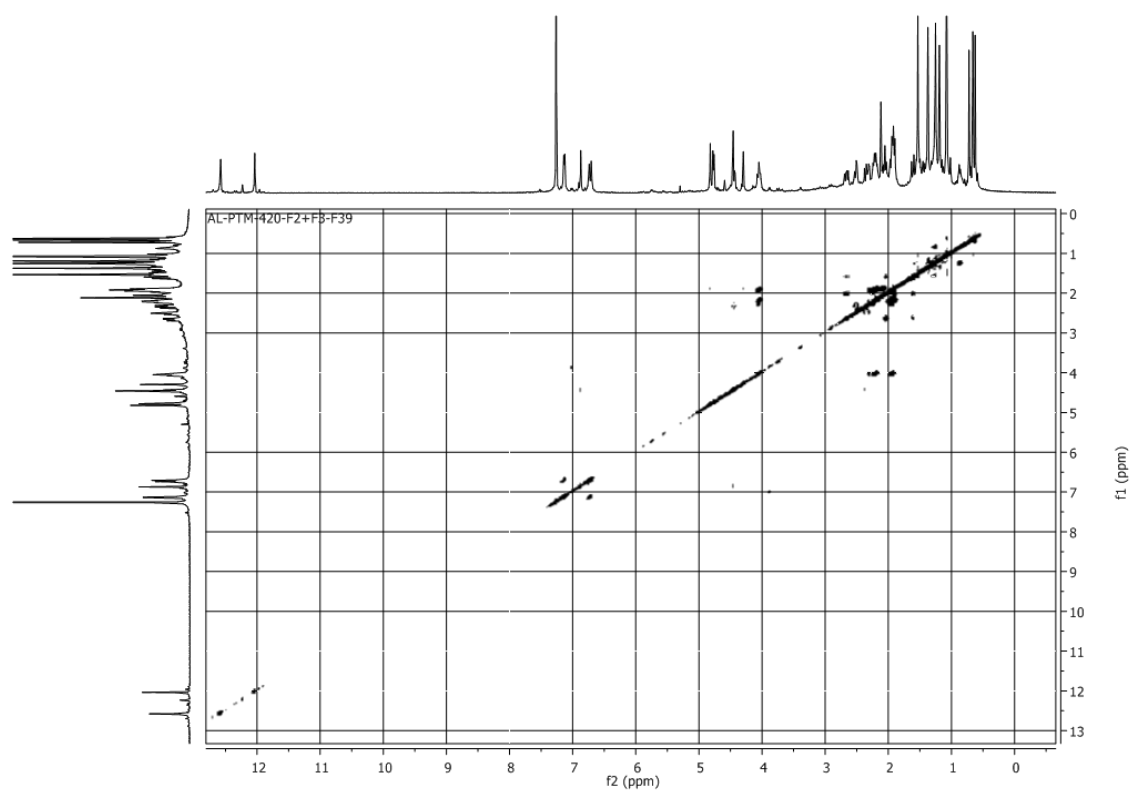


Figura vii-58 - Espectro TOCSY para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl_3

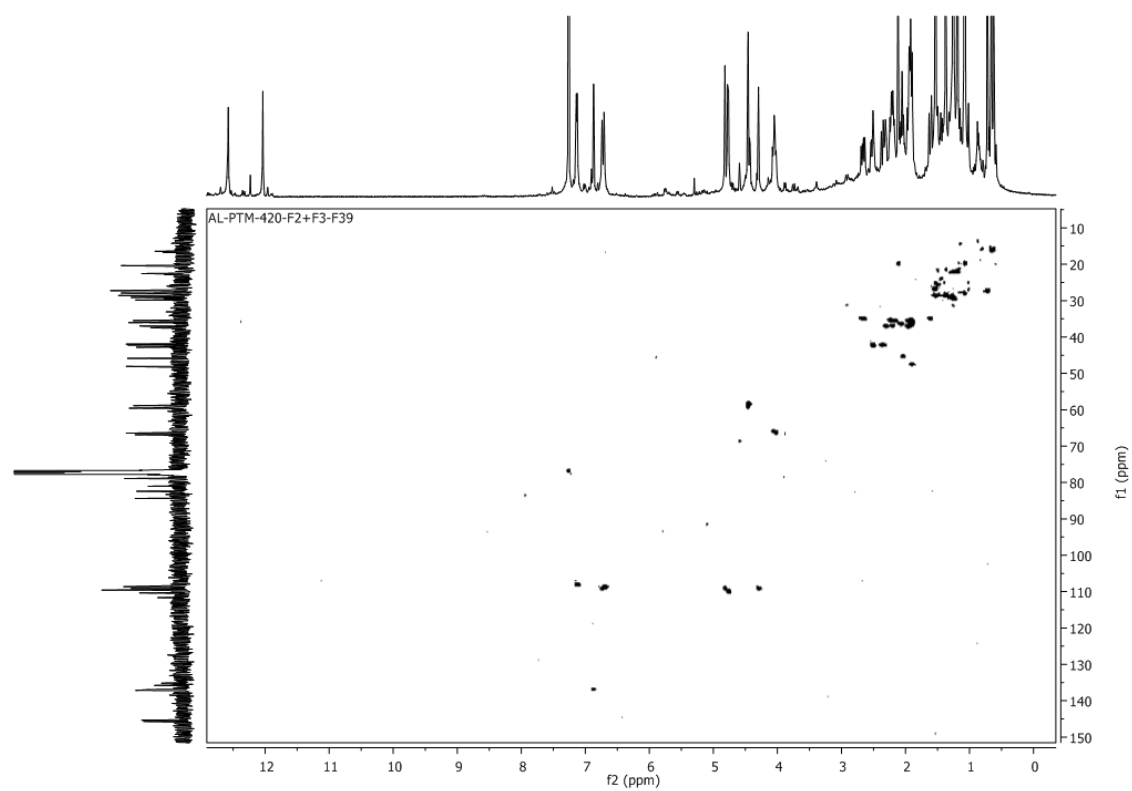


Figura vii-59 - Espectro HSQC para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl_3

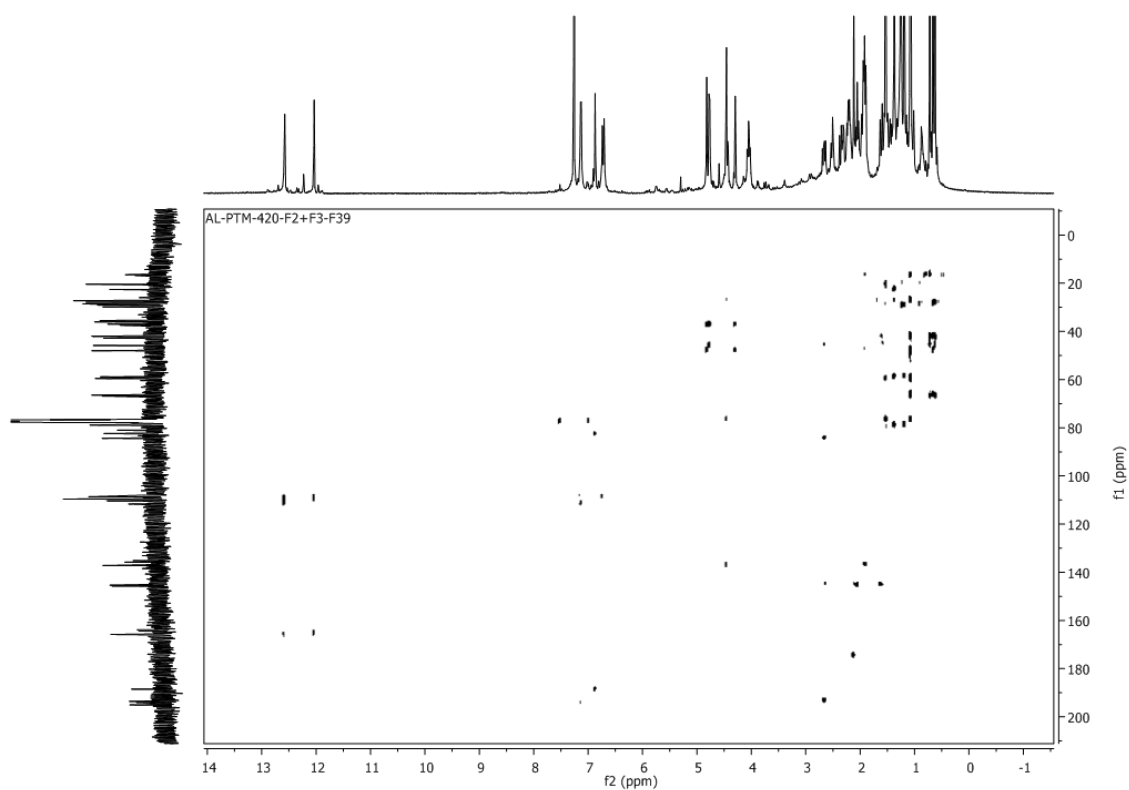


Figura vii-60 - Espectro HMBC para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl_3

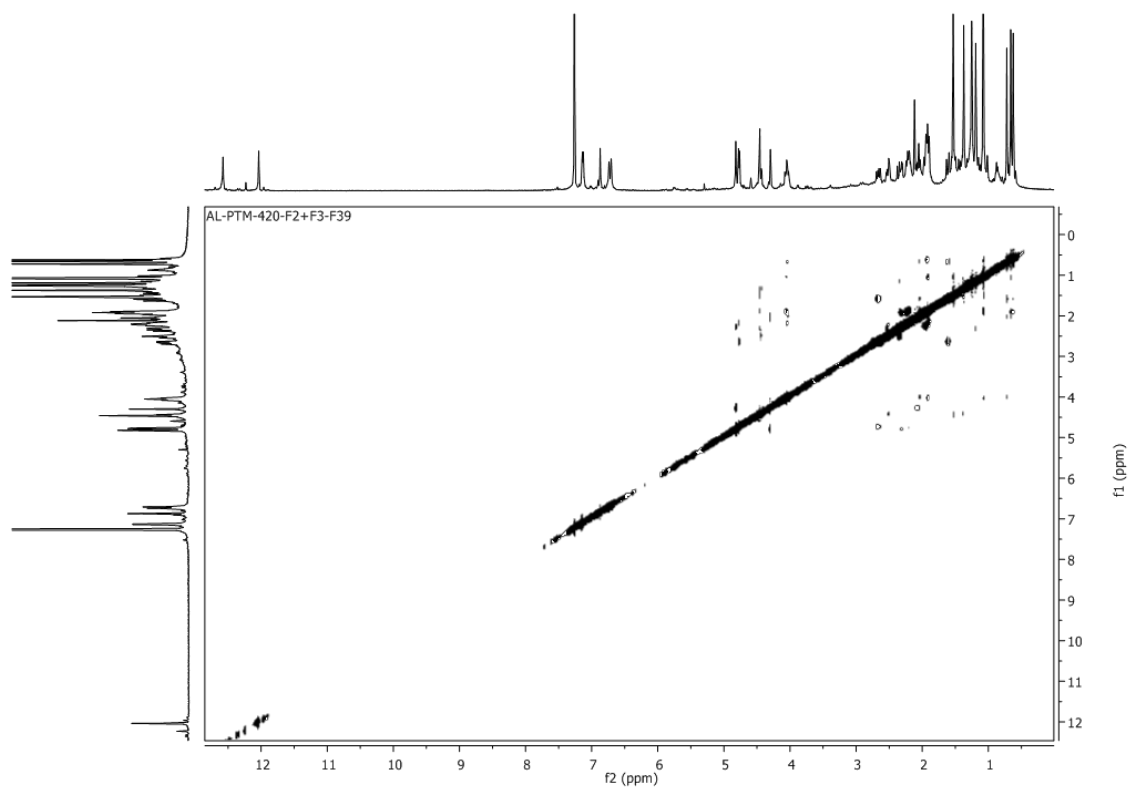


Figura vii-61 - Espectro NOESY para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CDCl_3

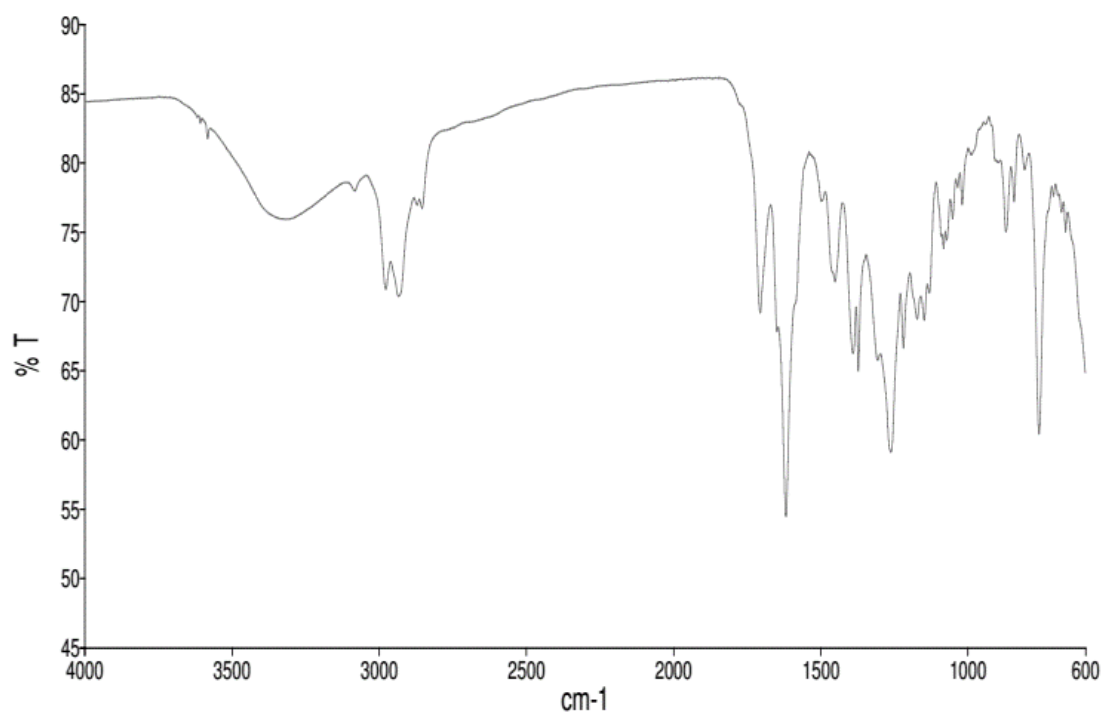
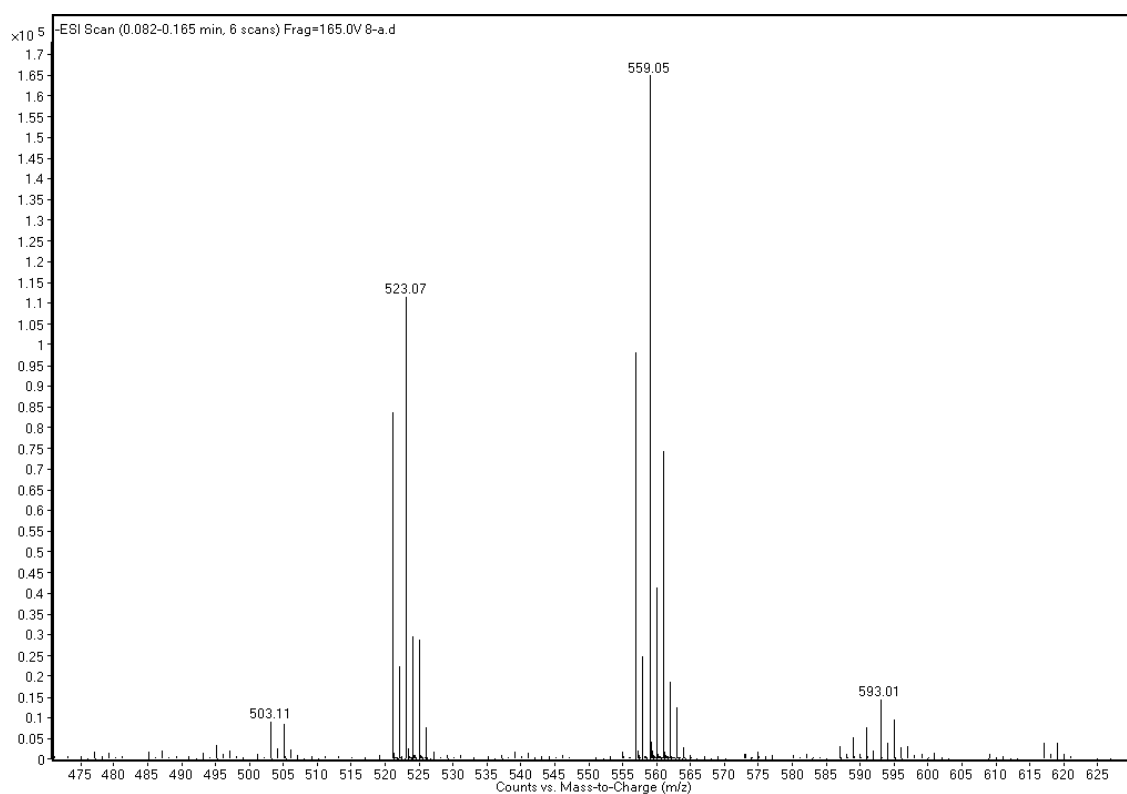
Figura vii-62 - Espectro IV para o composto PTM-420-F2+F3-F39, em CHCl_3 

Figura vii-63 - Espectro HR-ESI-MS para o composto PTM-420-F2+F3-F39

8. ESPECTROS PTM-420-F4-F15

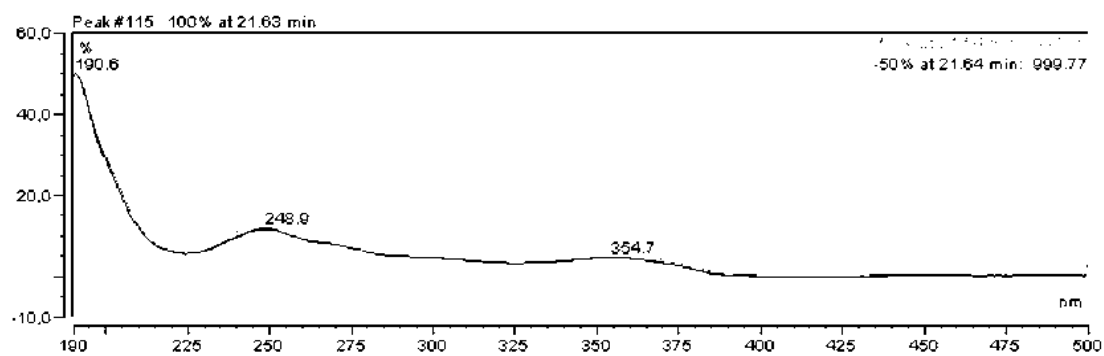


Figura vii-64 – Espectro UV do composto PTM-420-F4-F15

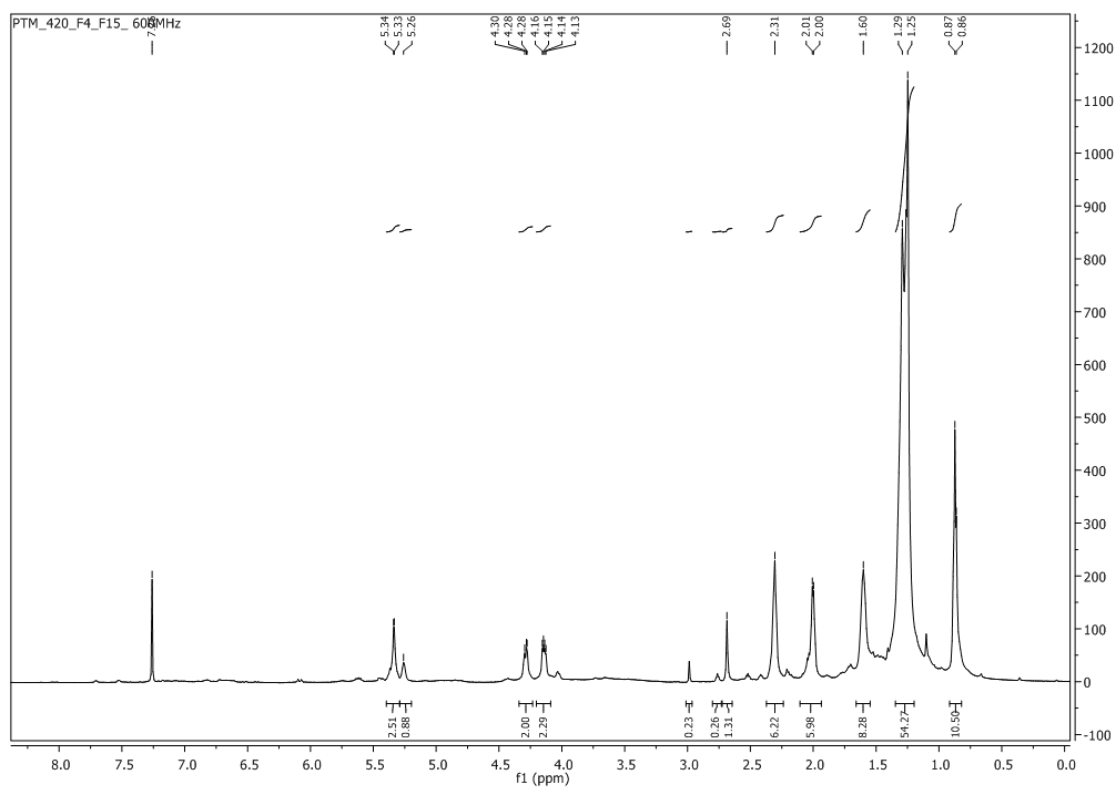


Figura vii-65 - Espectro ^1H do composto PTM-420-F4-F15, em CDCl_3

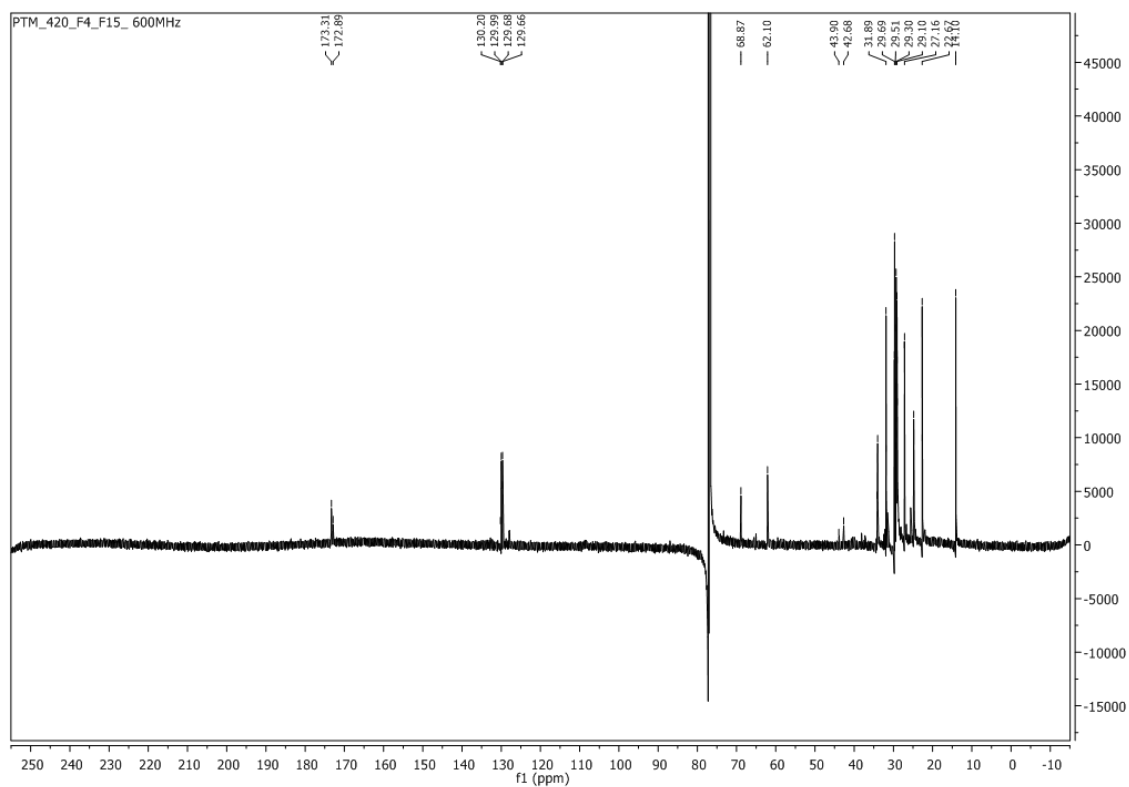


Figura vii-66 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F4-F15, em CDCl_3

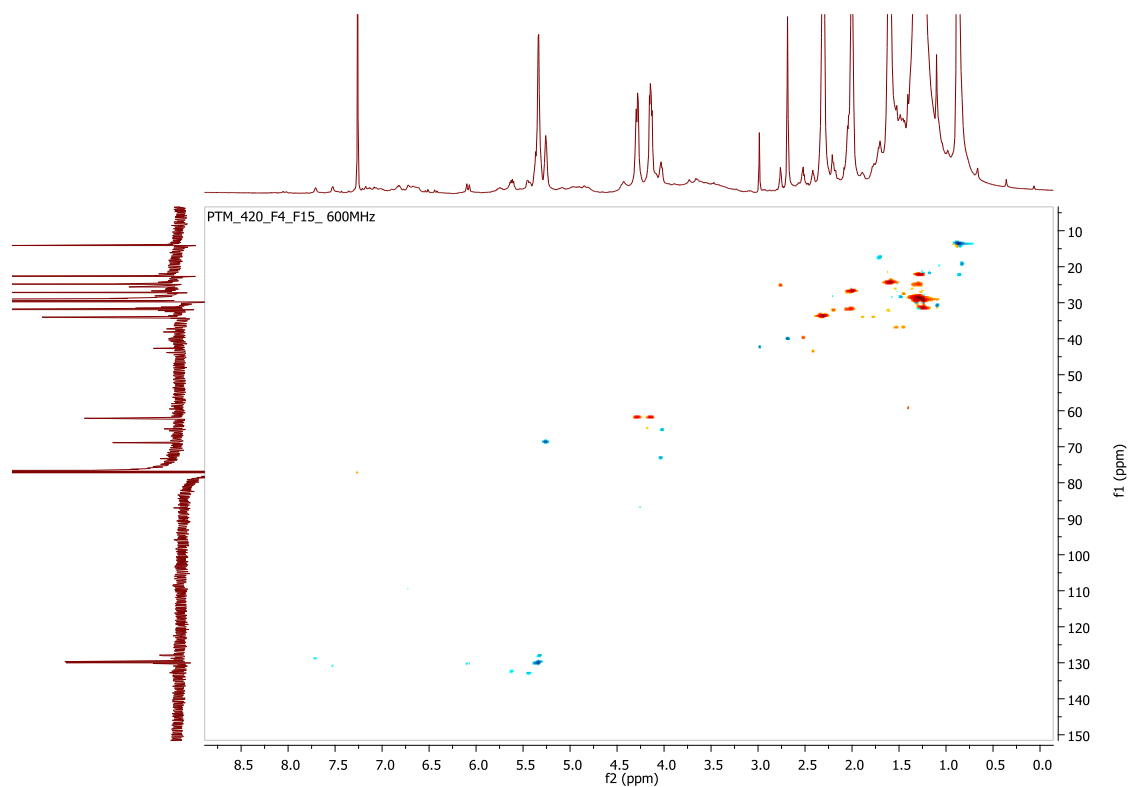
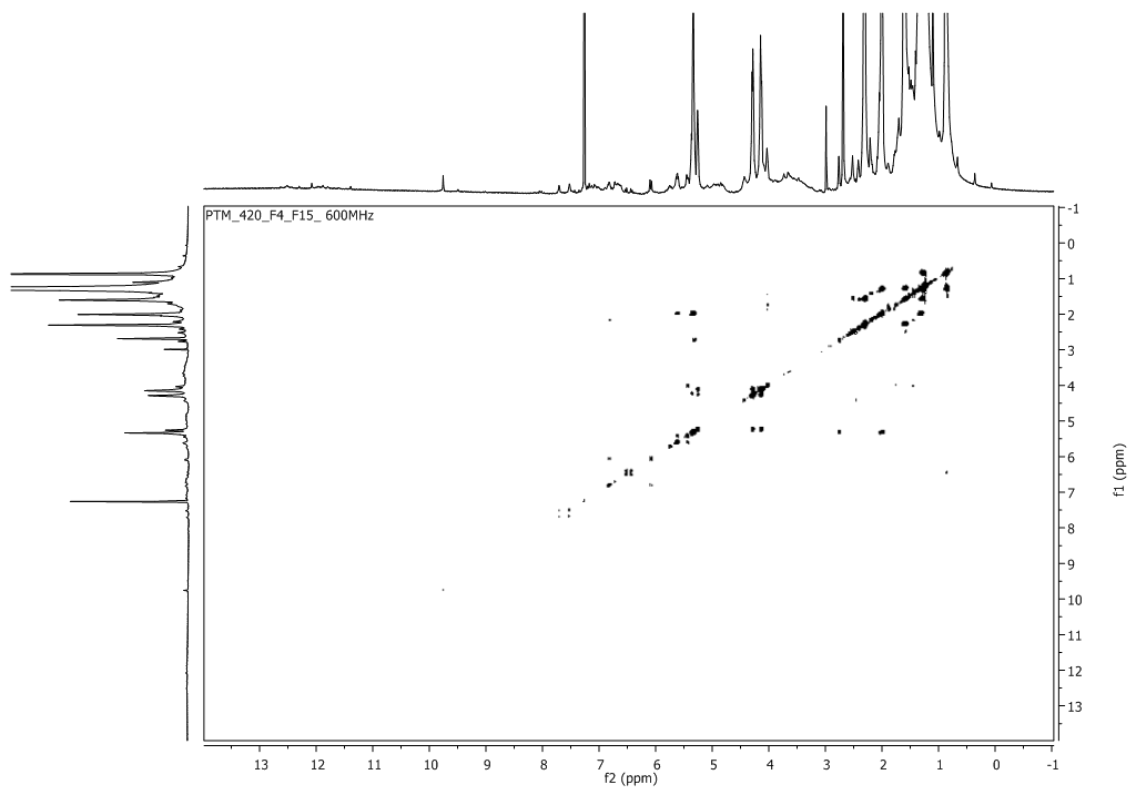
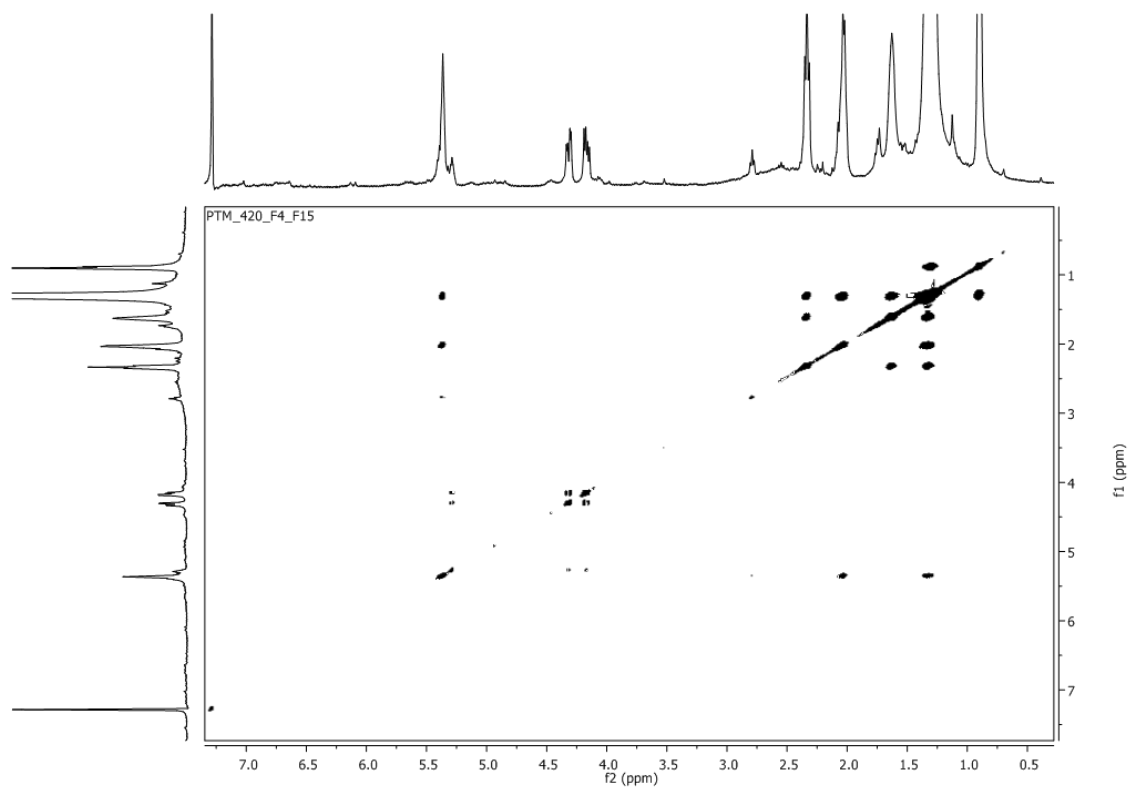


Figura vii-67 - Espectro HSQC-editado do composto PTM-420-F4-F15, em CDCl_3

Figura vii-68 - Espectro COSY do composto PTM-420-F4-F15, CDCl_3 FIGURA VII-69 - ESPECTRO TOCSY DO COMPOSTO PTM-420-F4-F15, CDCl_3

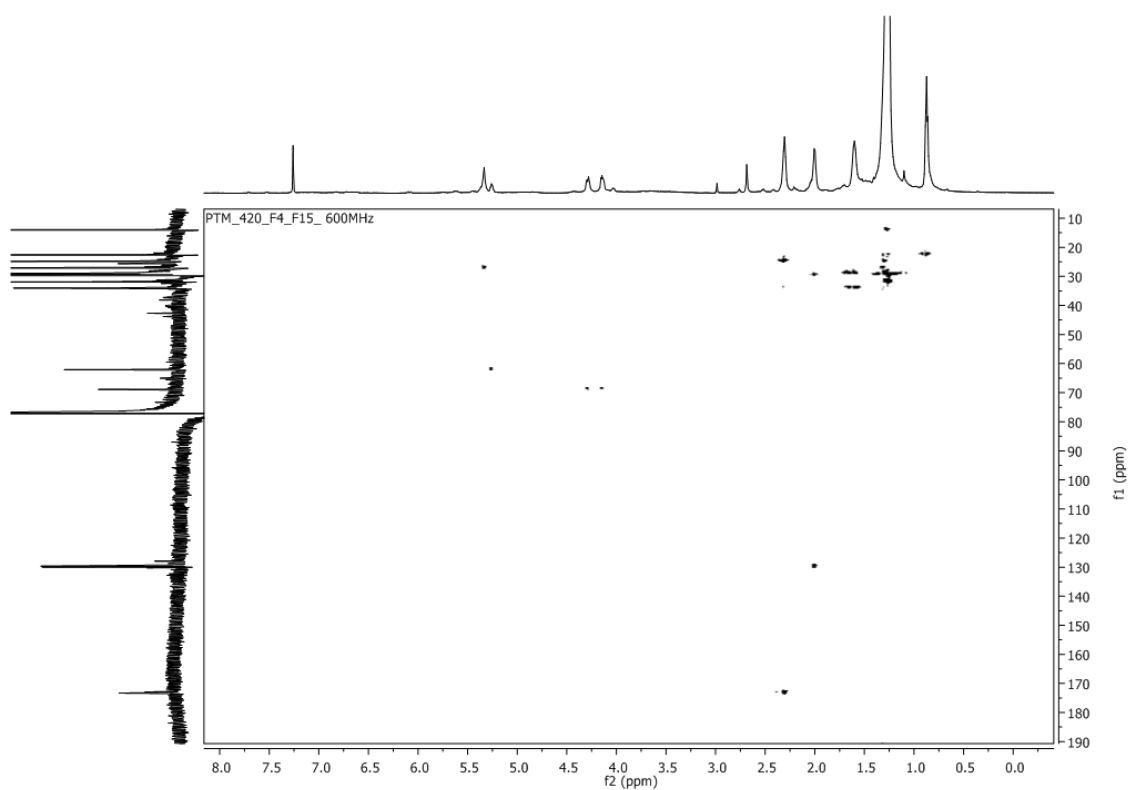


Figura vii-70 - Espectro *1-1-Adequate* do composto PTM-420-F4-F15, CDCl_3

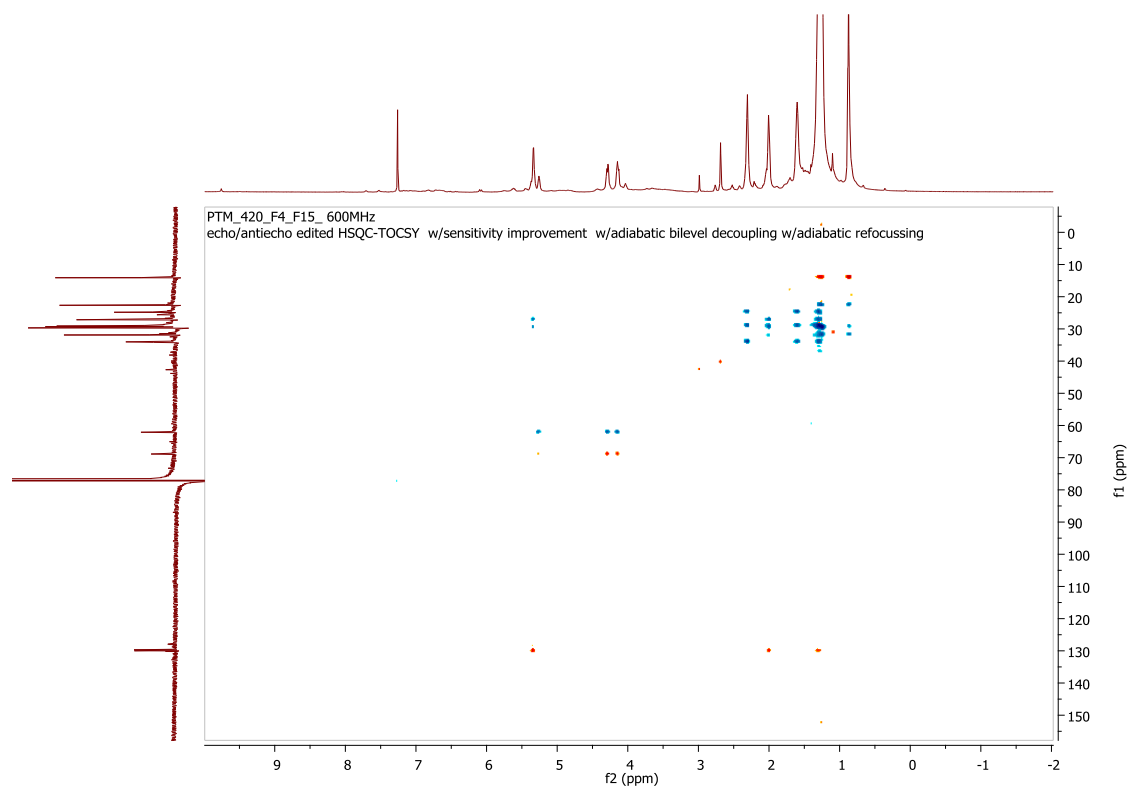
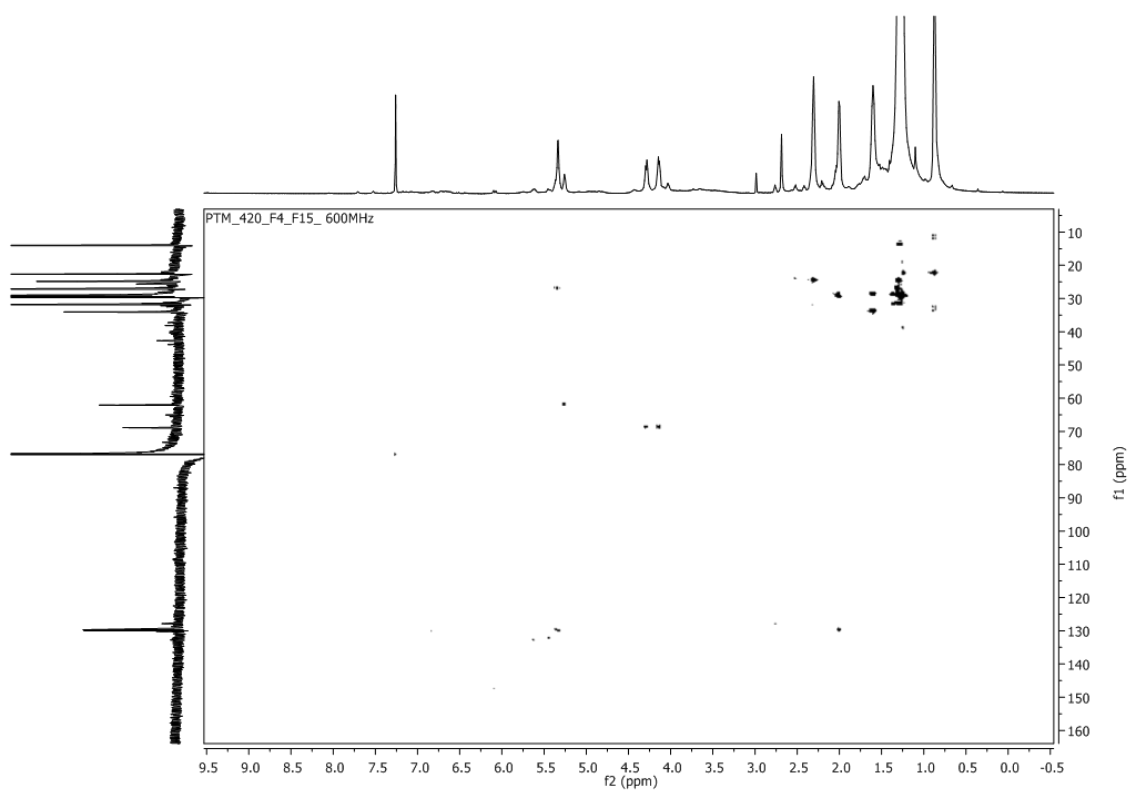
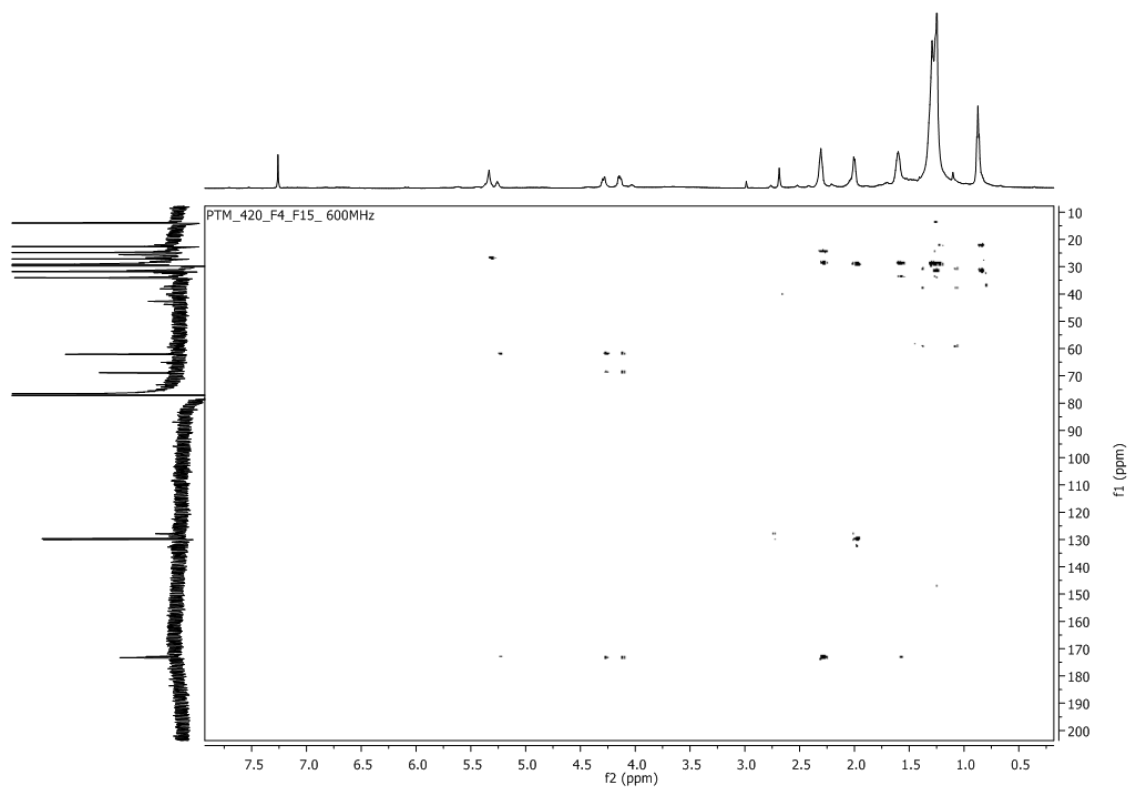


Figura vii-71 - Espectro HSQC-TOCSY editado do composto PTM-420-F4-F15, CDCl_3

Figura vii-72 - Espectro H2BC do composto PTM-420-F4-F15, CDCl_3 FIGURA VII-73 - ESPECTRO HMBC DO COMPOSTO PTM-420-F4-F15, CDCl_3

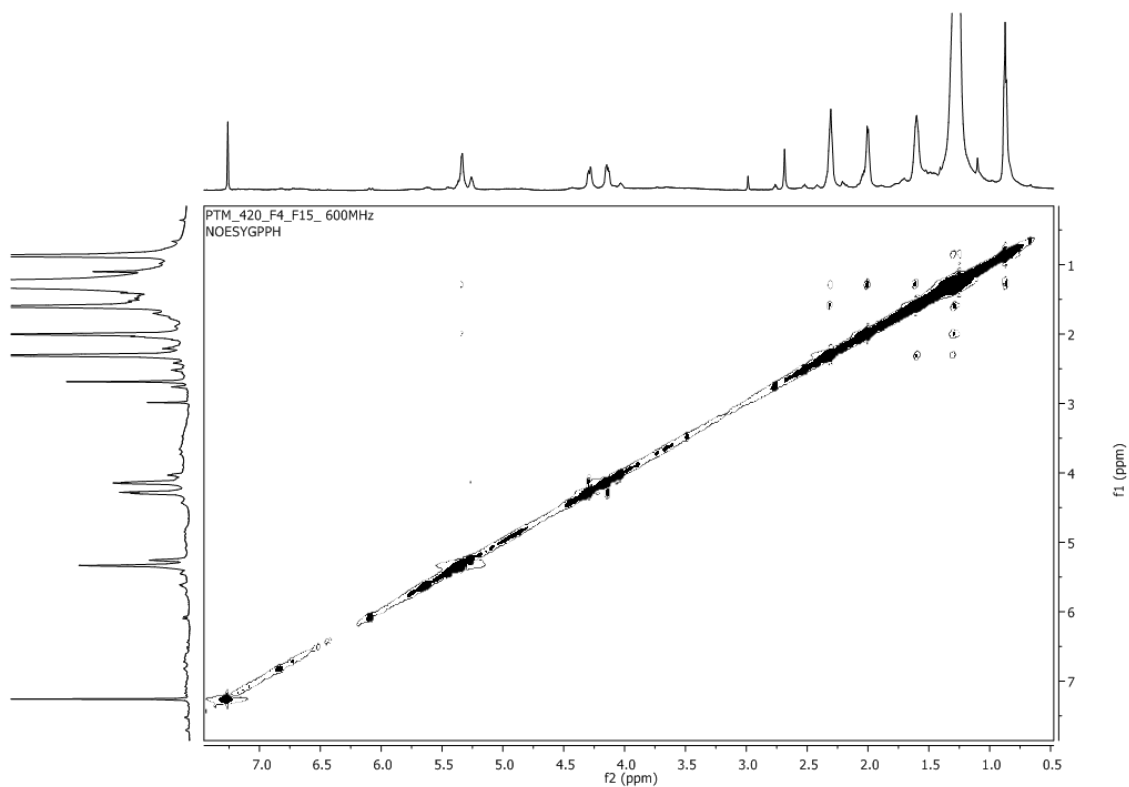


Figura vii-74 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F4-F15, CDCl_3

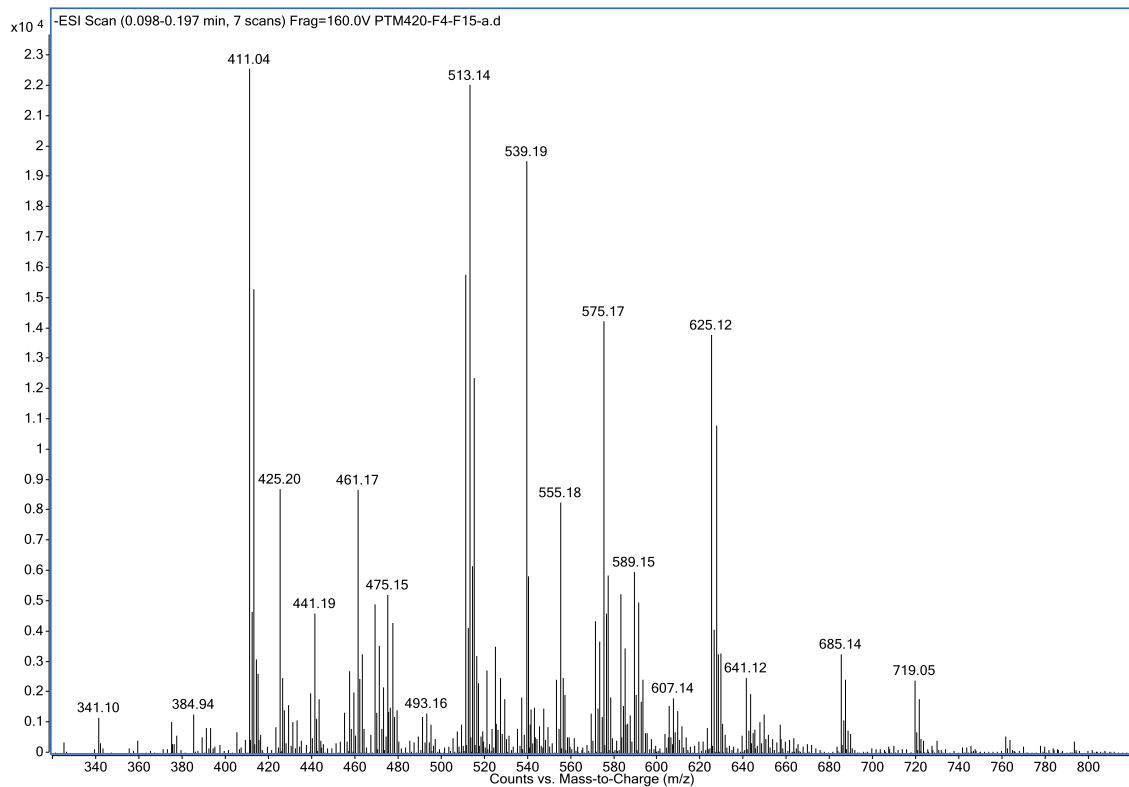


Figura vii-75 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F4-F15

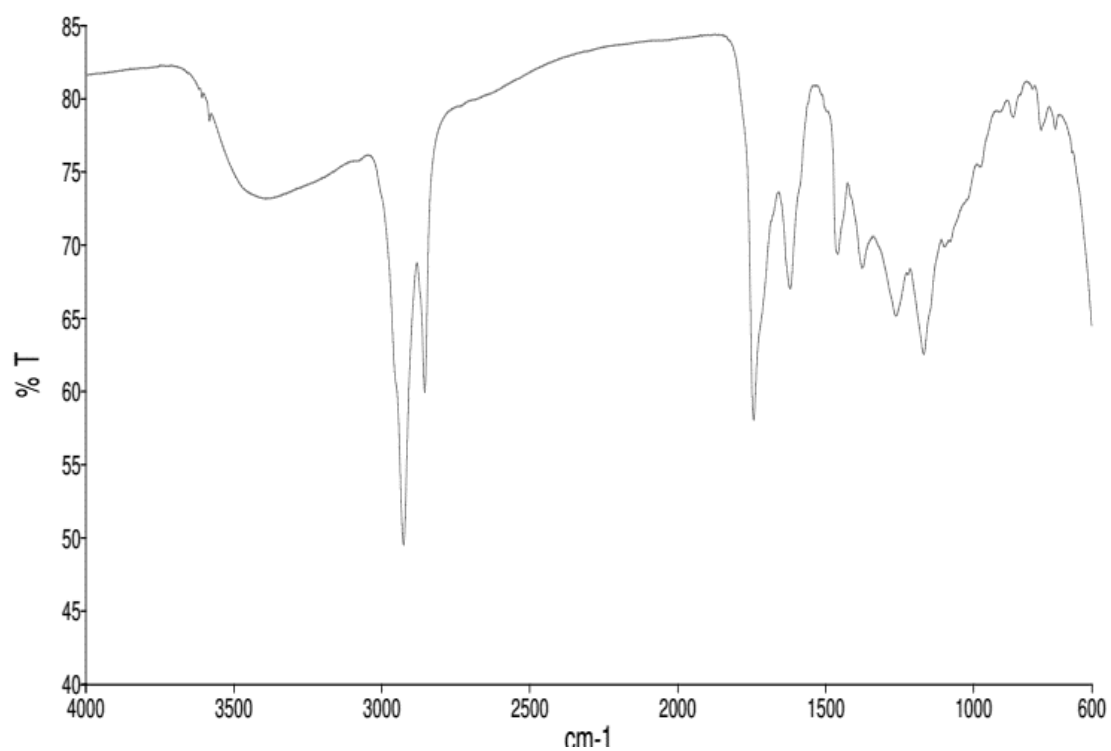


Figura vii-76 - Espectro IV do composto PTM-420-F4-F15, em CHCl_3

9. ESPECTROS PTM-420-F5-F31

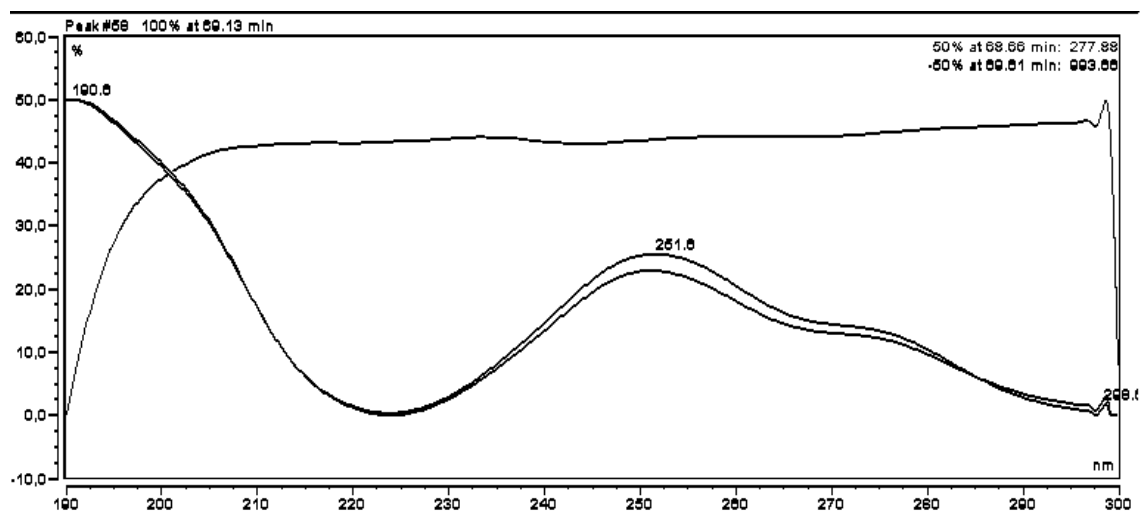


Figura vii-77 – Espectro UV do composto PTM-420-F5-F31

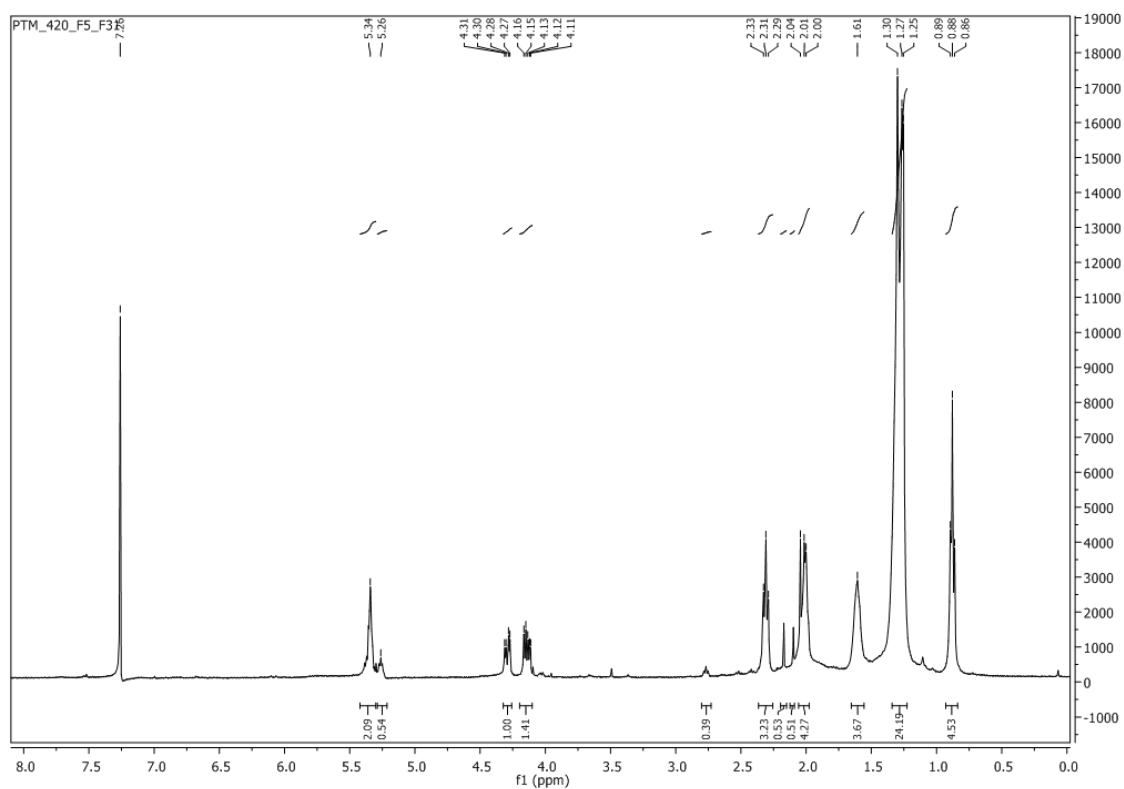


Figura vii-78 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F31, em CDCl_3

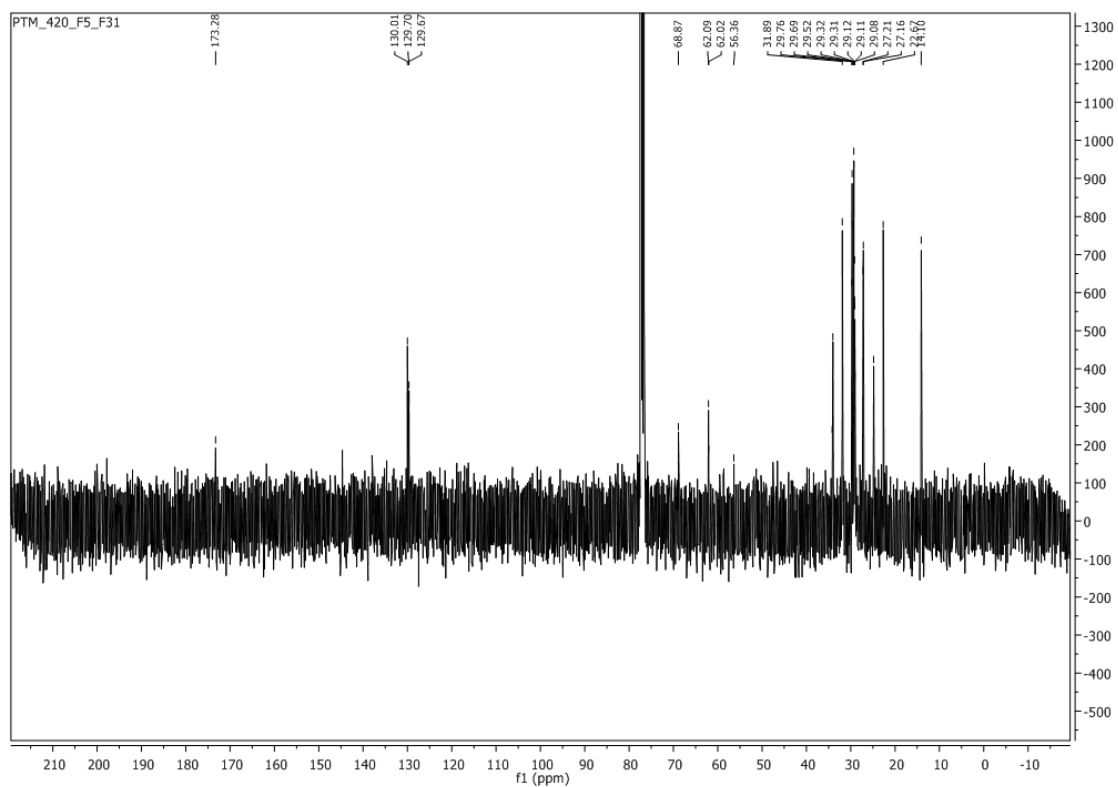


Figura vii-79 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F5-F31, em CDCl_3

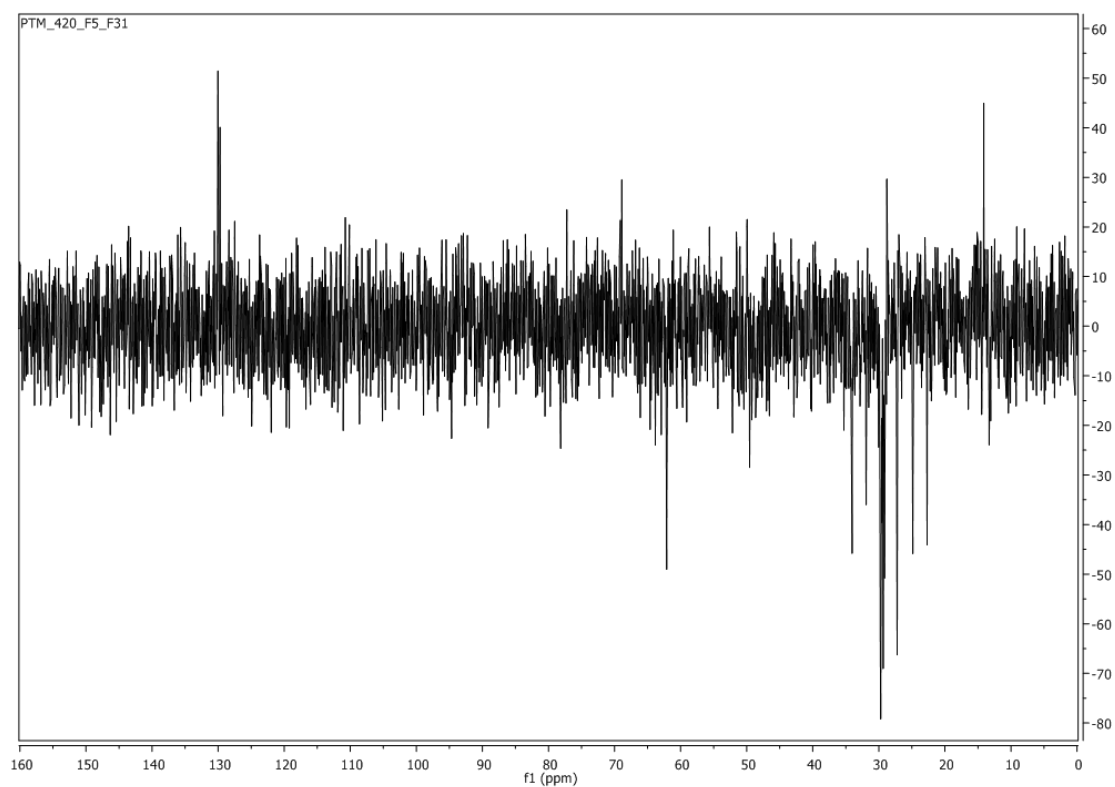


Figura vii-80 - Espectro ^{13}C DEPT 135 do composto PTM-420-F5-F31, em CDCl_3

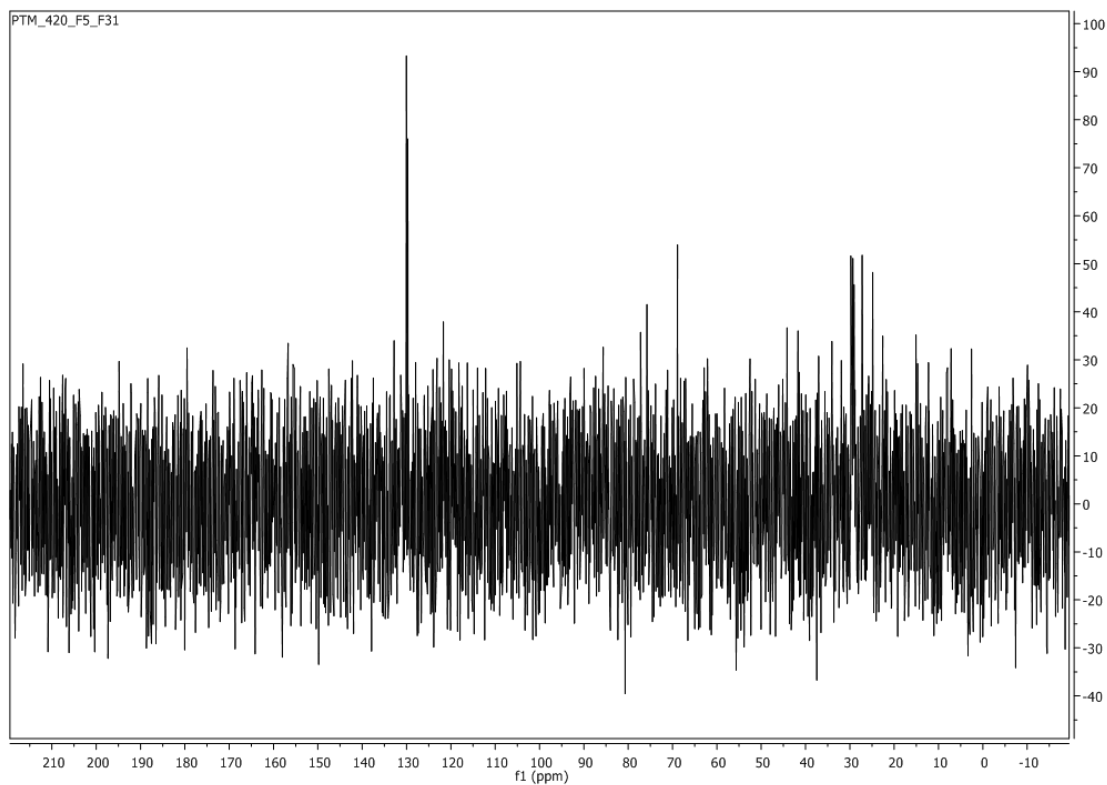


Figura vii-81 - Espectro ^{13}C DEPT 90 do composto PTM-420-F5-F31, em CDCl_3

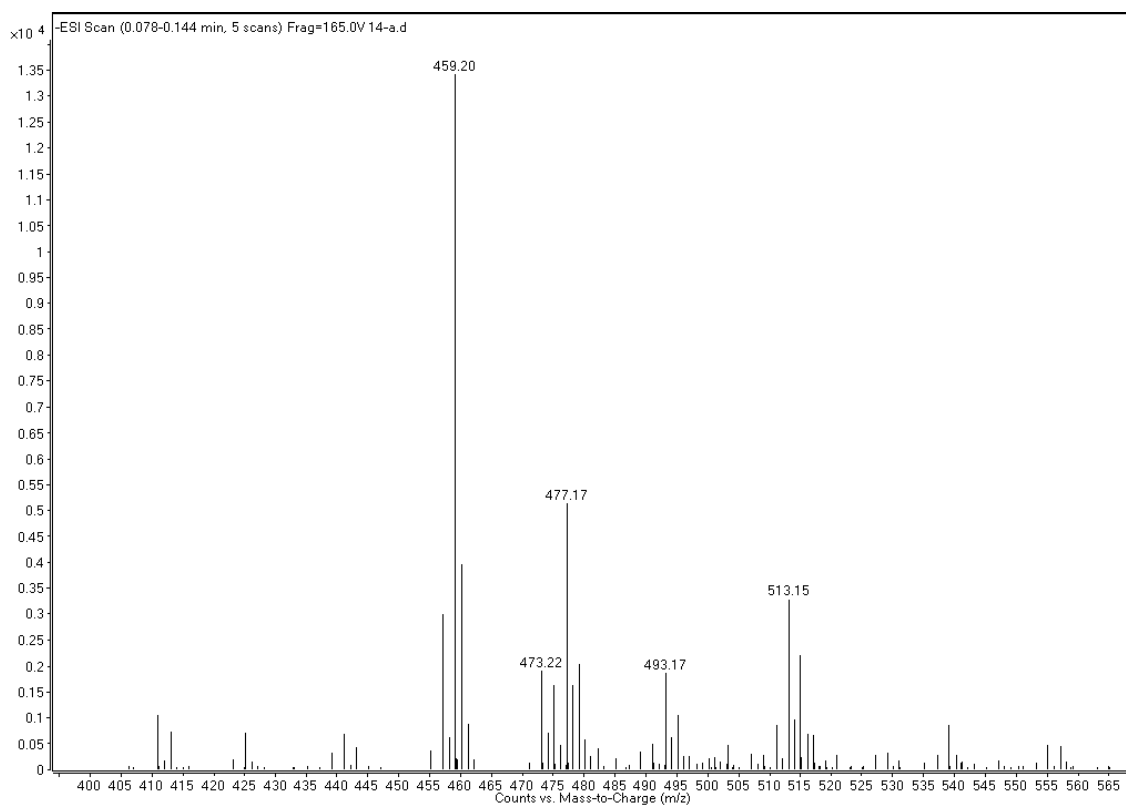


Figura vii-82 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F31

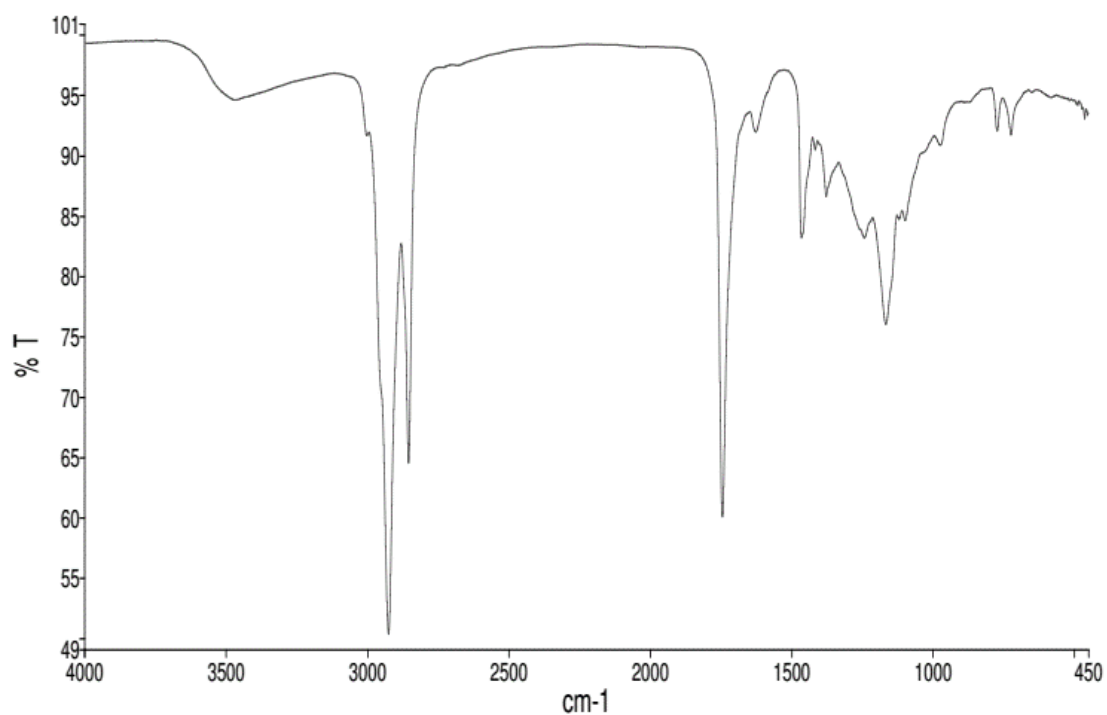


Figura vii-83 - Espectro IV do composto PTM-420-F5-F31, em CHCl_3

10. ESPECTROS PTM-420-F5-F38

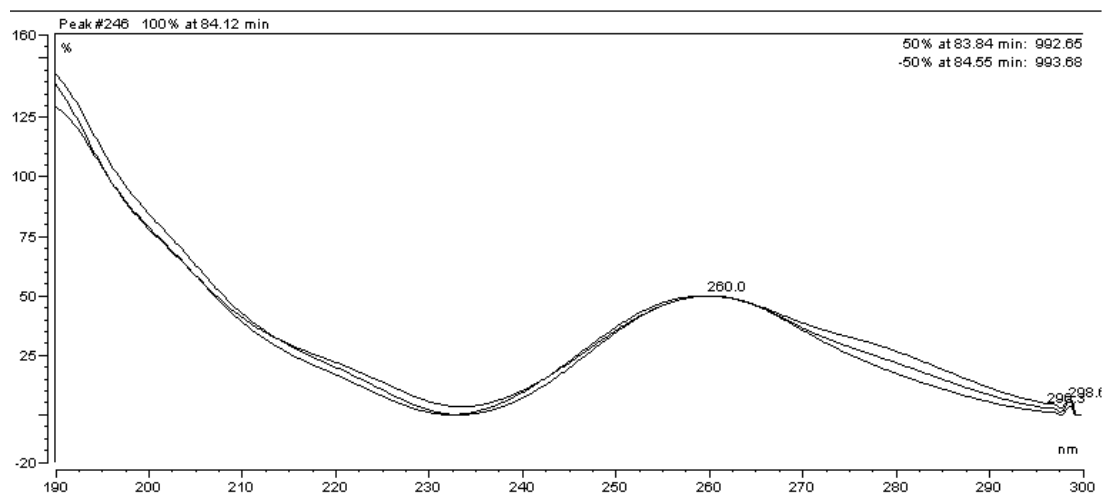
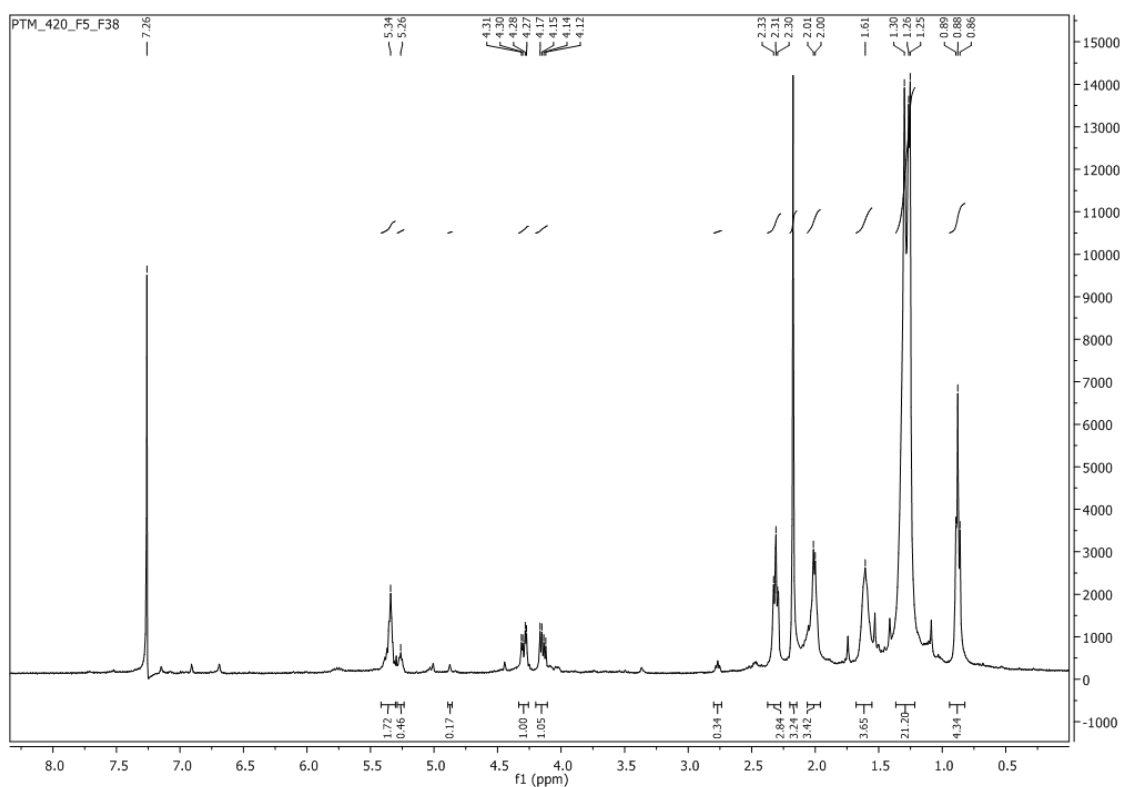


Figura vii-84 – Espectro UV do composto PTM-420-F5-F38

Figura vii-85 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F38, em CDCl_3

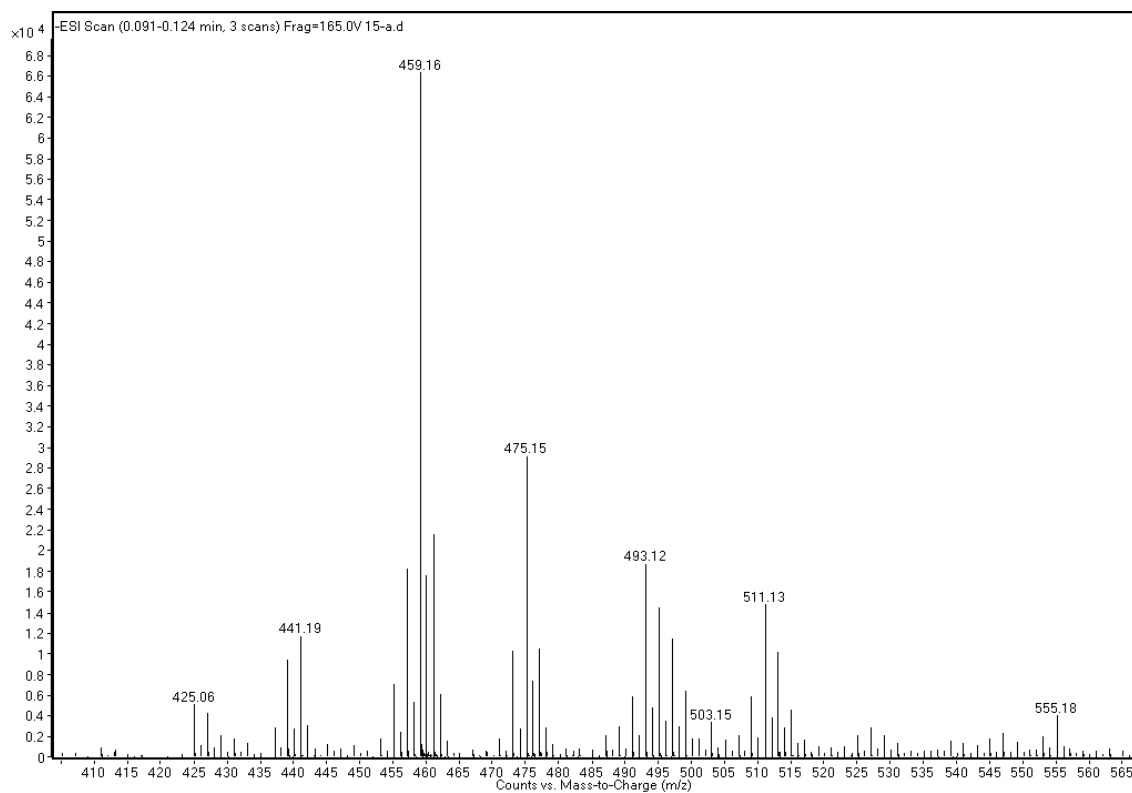


Figura vii-86 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F38, em CDCl_3

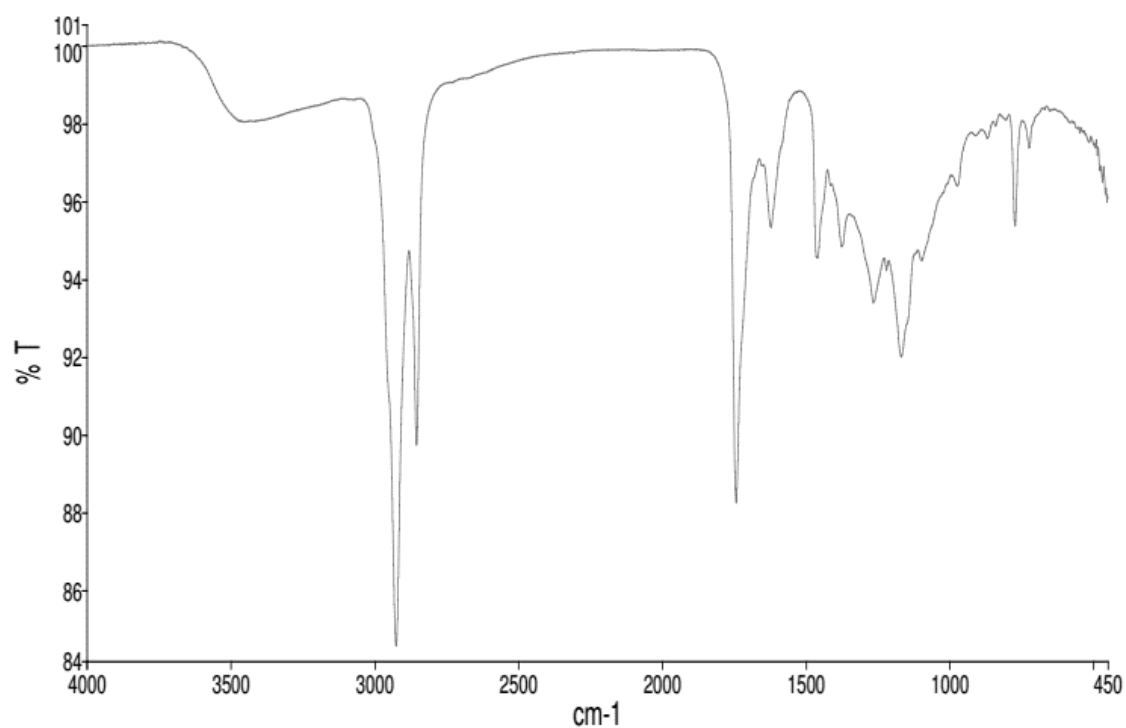


Figura vii-87 - Espectro IV do composto PTM-420-F5-F38, em CHCl_3

11. ESPECTROS PTM-420-F5-F42

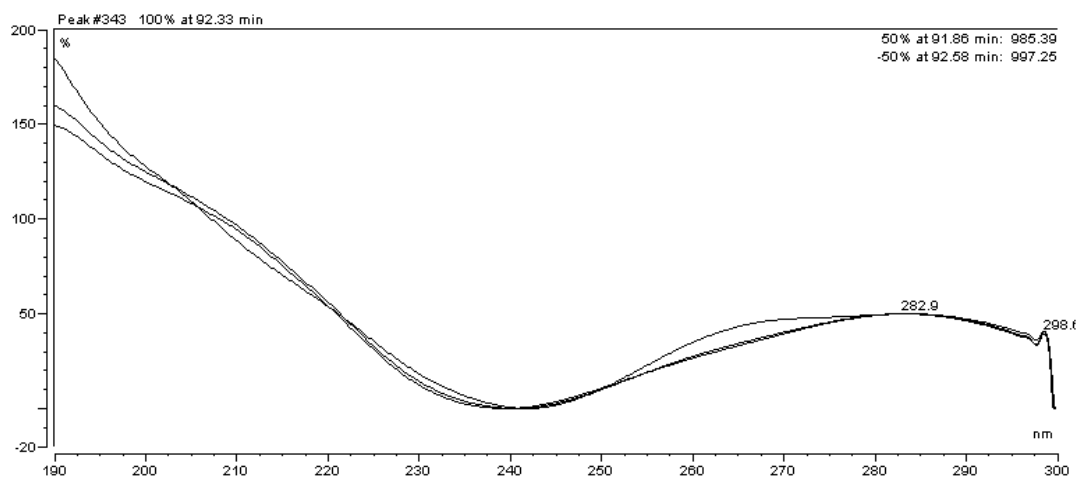


Figura vii-88 – Perfil UV do composto PTM-420-F5-F42

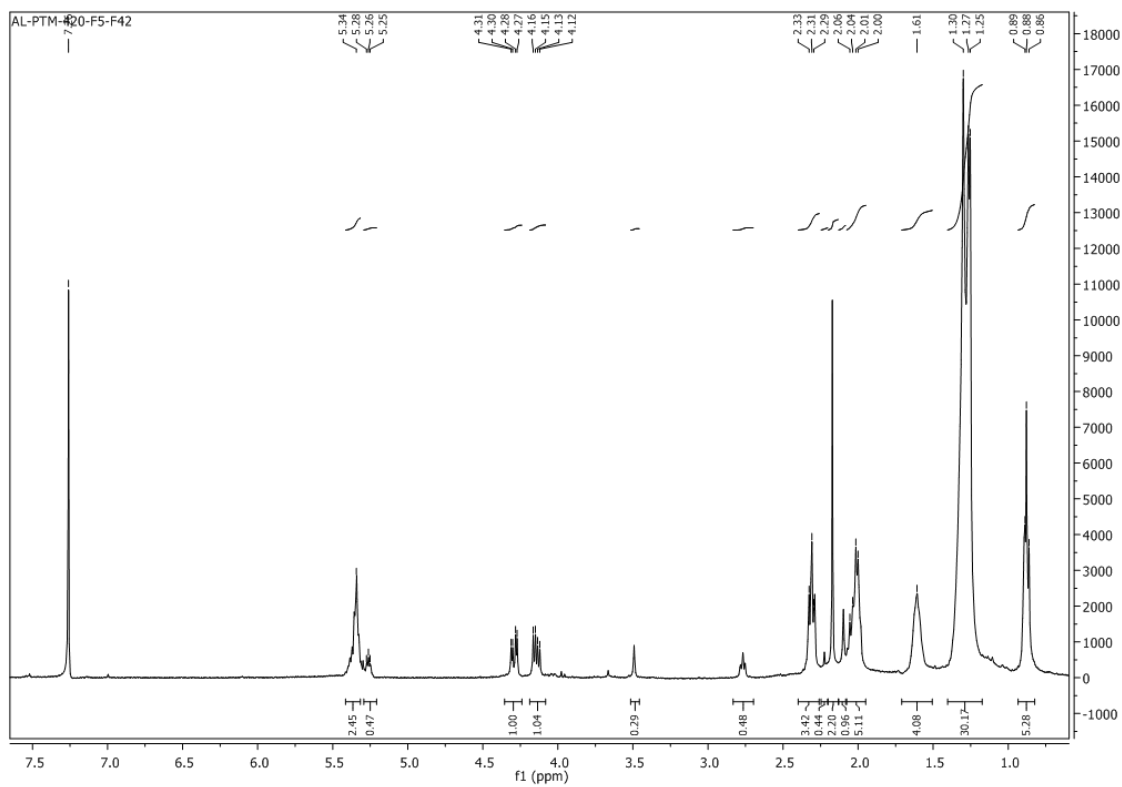


Figura vii-89 - Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F42, em CDCl_3

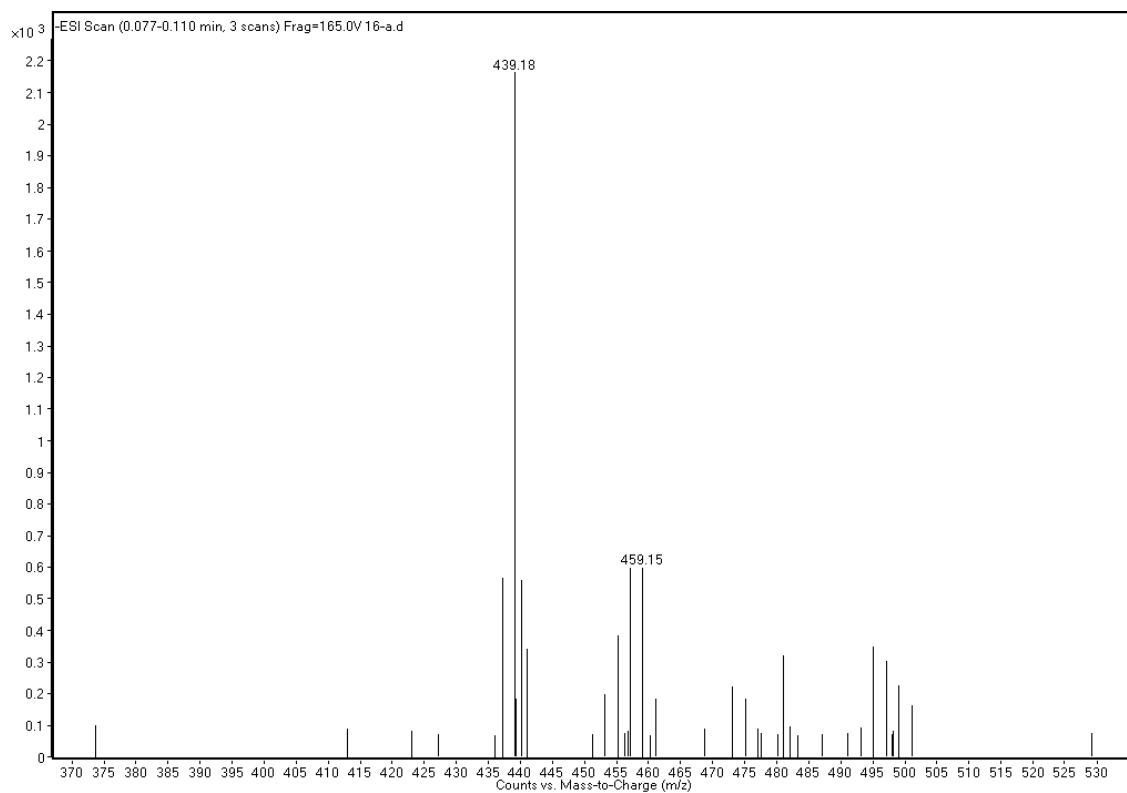
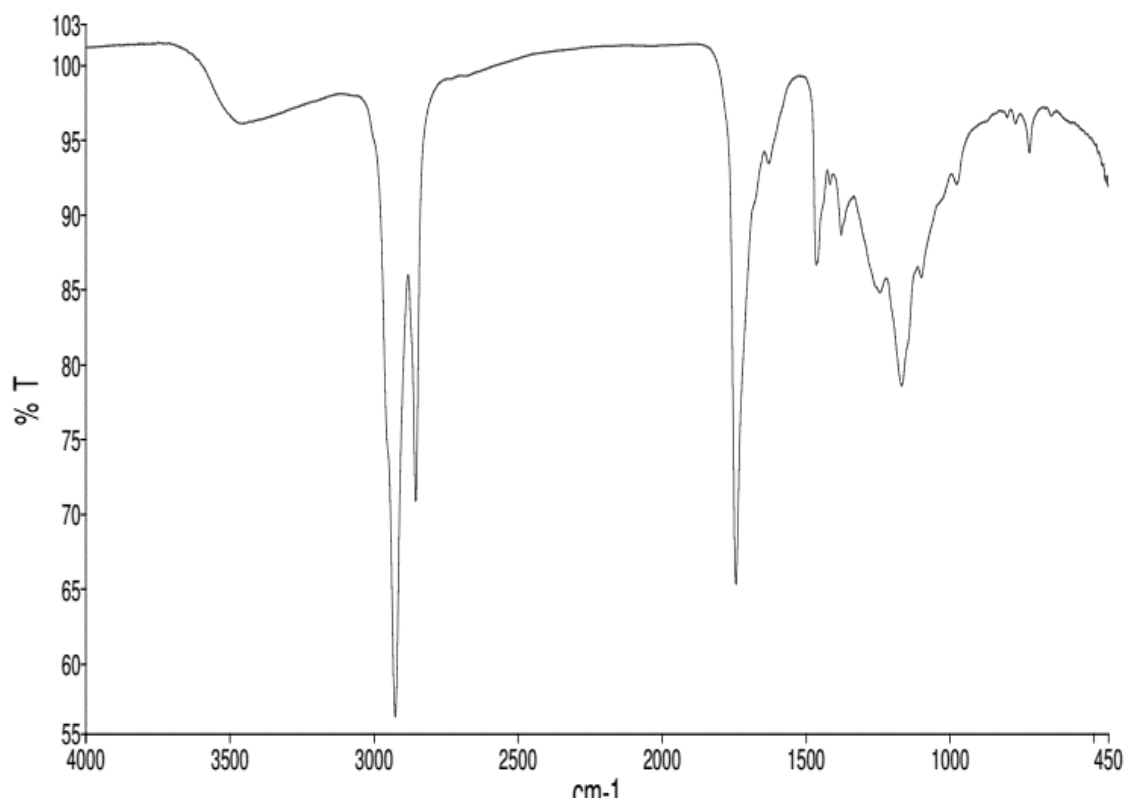


Figura vii-90 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F42

Figura vii-91 - Espectro IV do composto PTM-420-F5-F42, em CHCl₃

12. ESPECTROS PTM-420-F5-F43

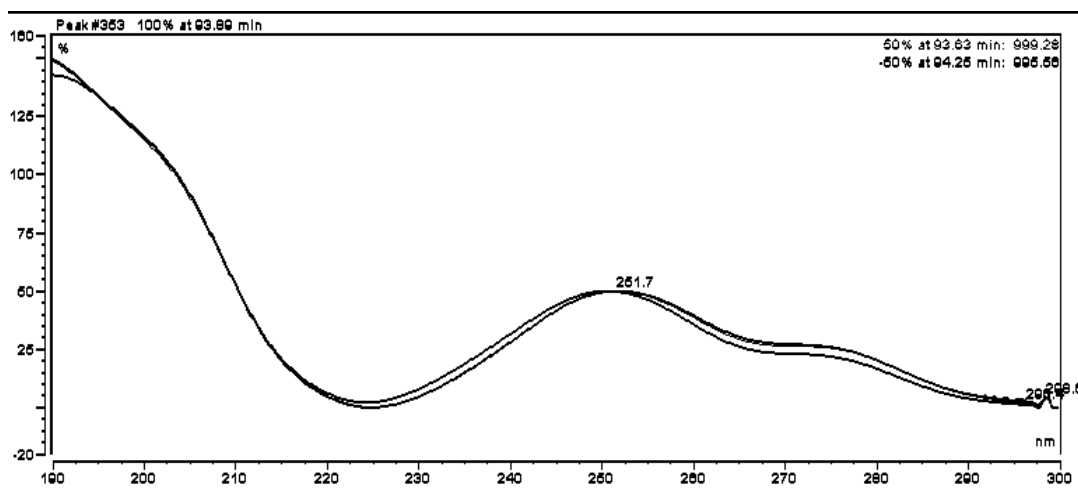
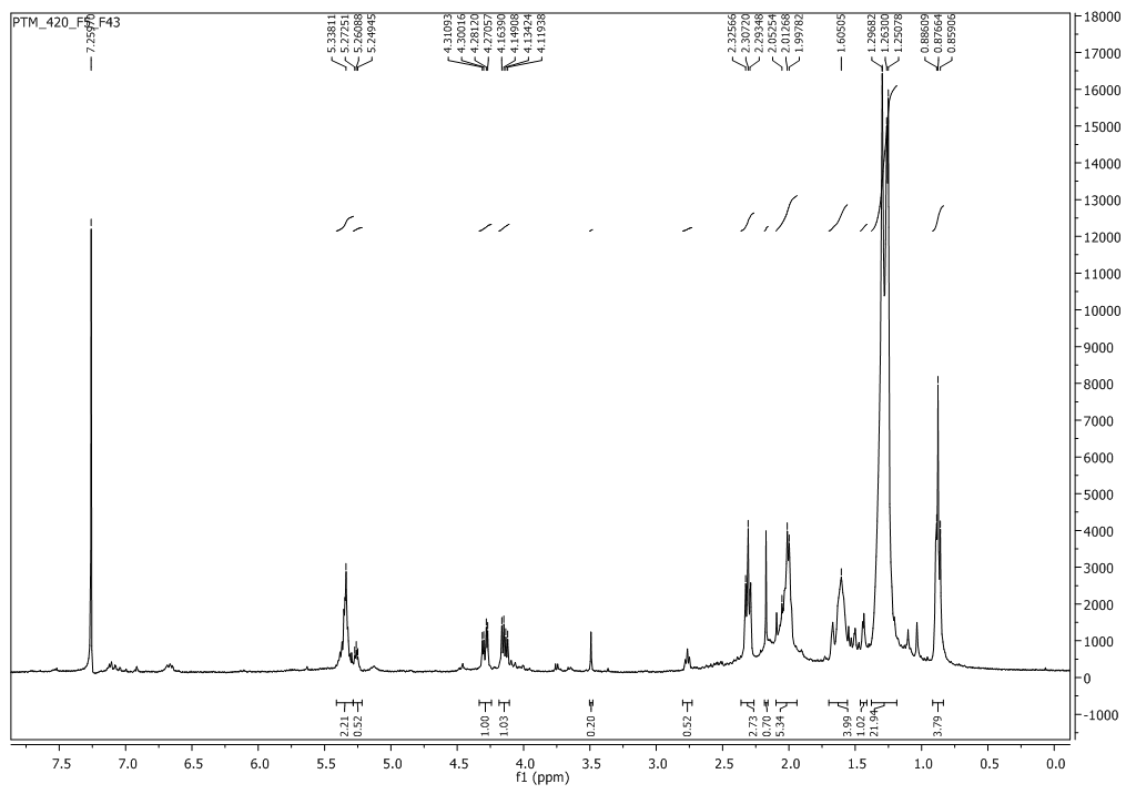


Figura vii-92 – Perfil UV do composto PTM-420-F5-F43

Figura vii-93 - Espectro ¹H do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl₃

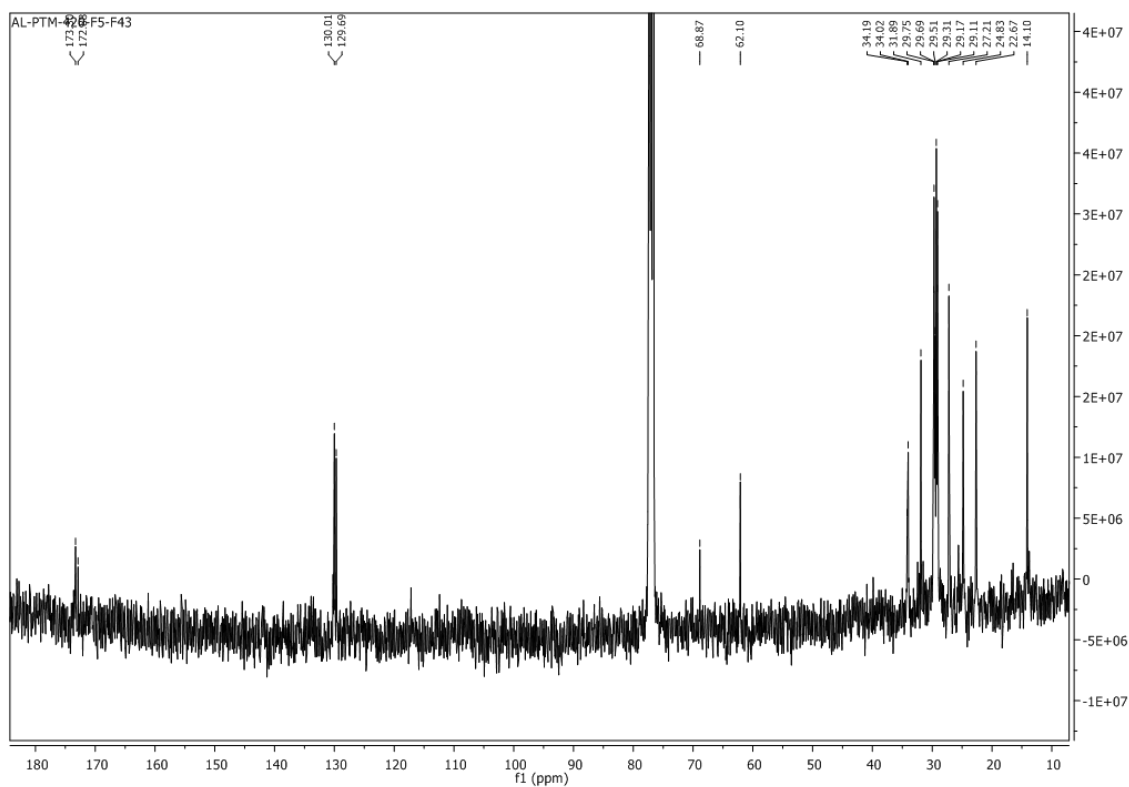


Figura vii-94 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl_3

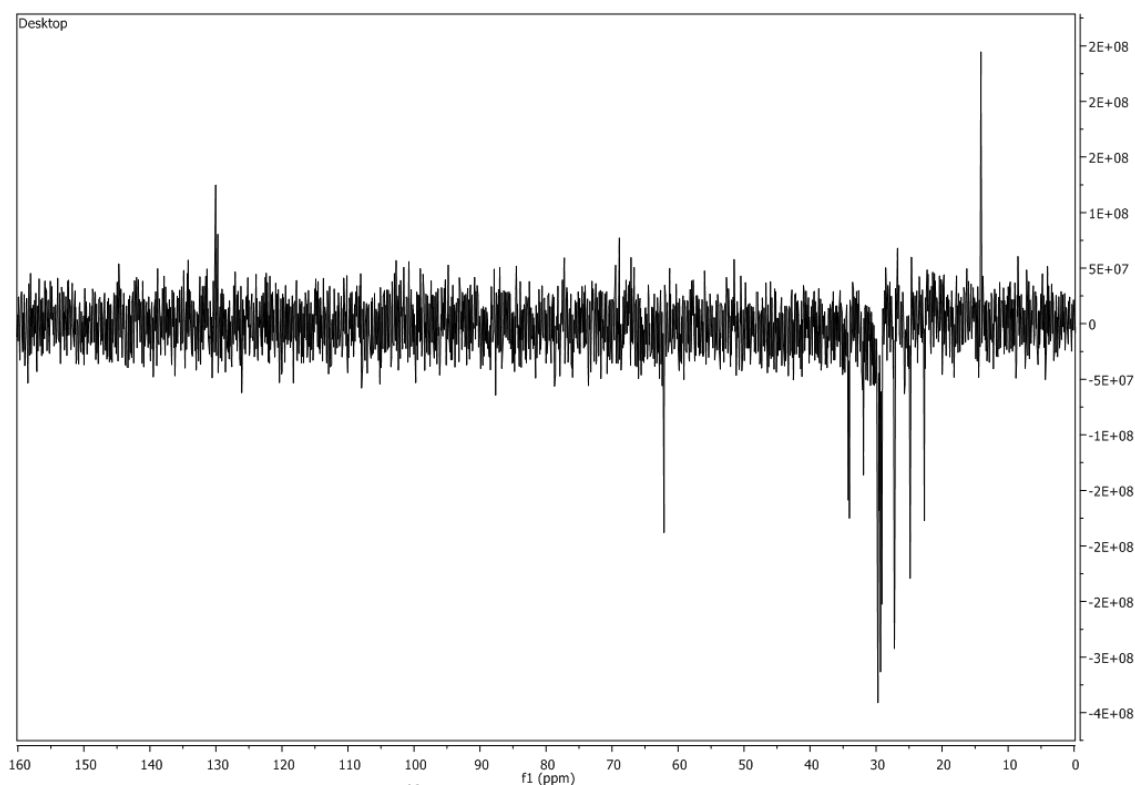


Figura vii-95 - Espectro ^{13}C DEPT 90 do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl_3

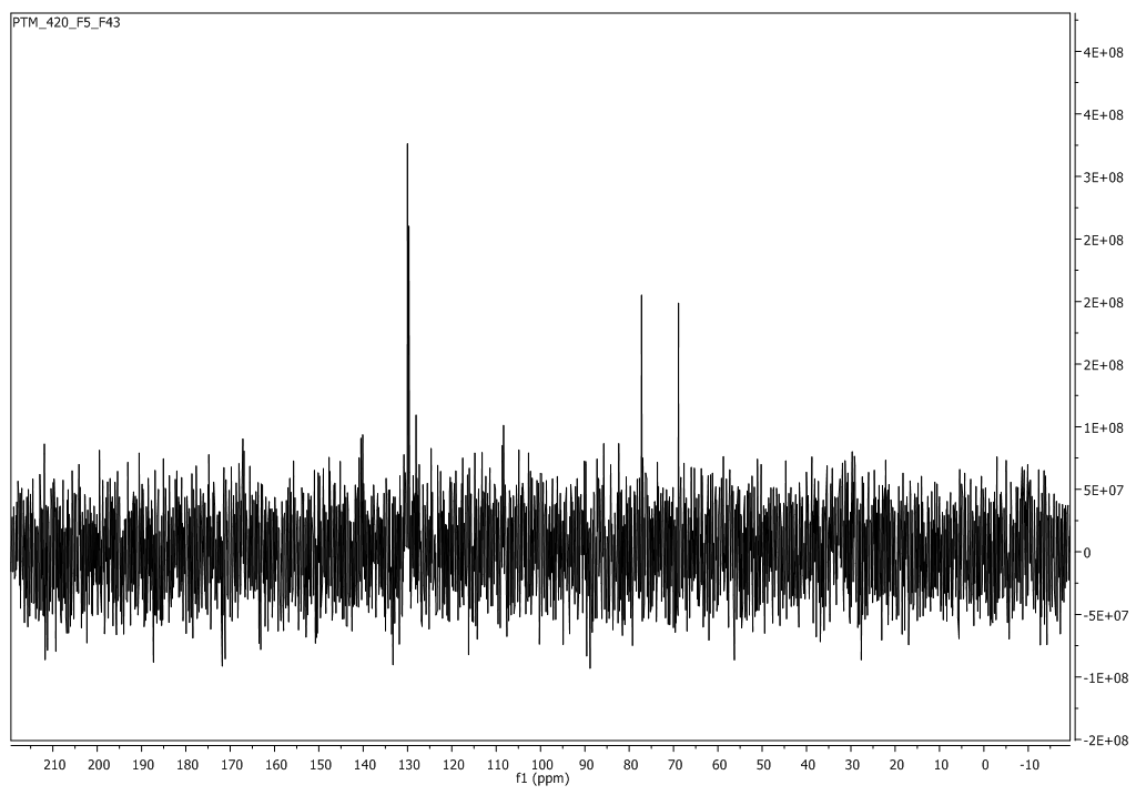


Figura vii-96 - Espectro ^{13}C DEPT 135 do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl_3

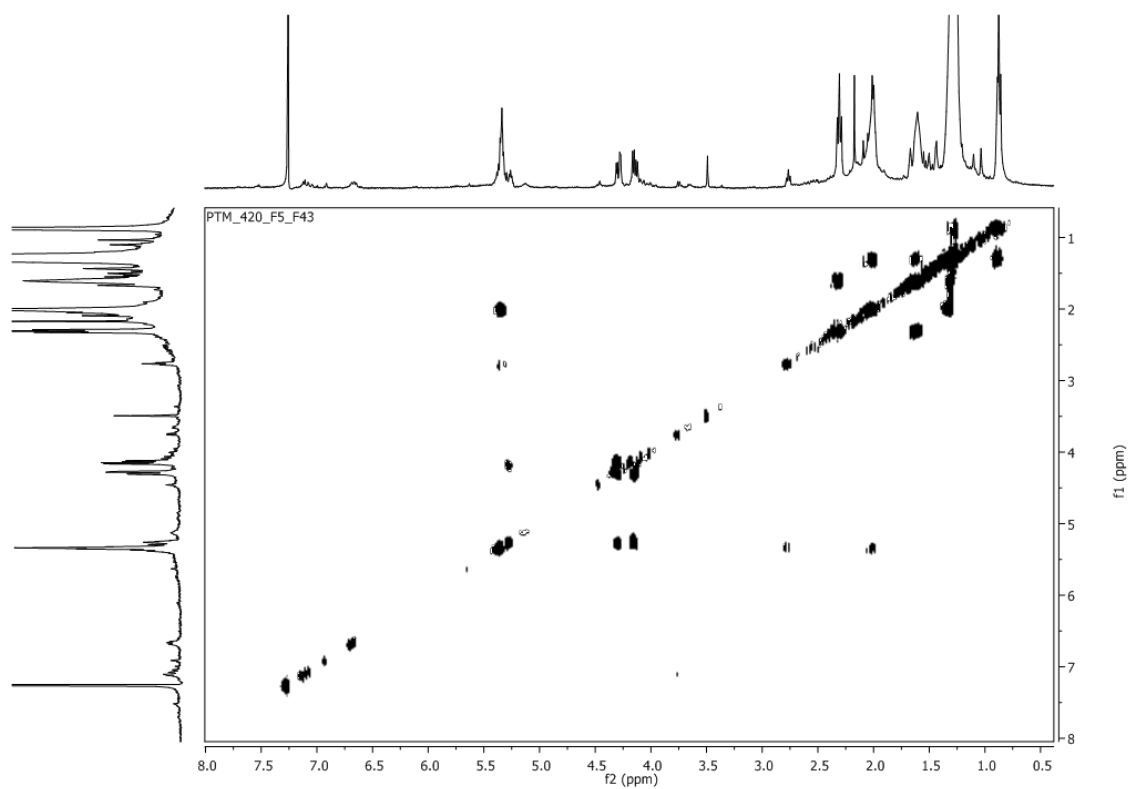
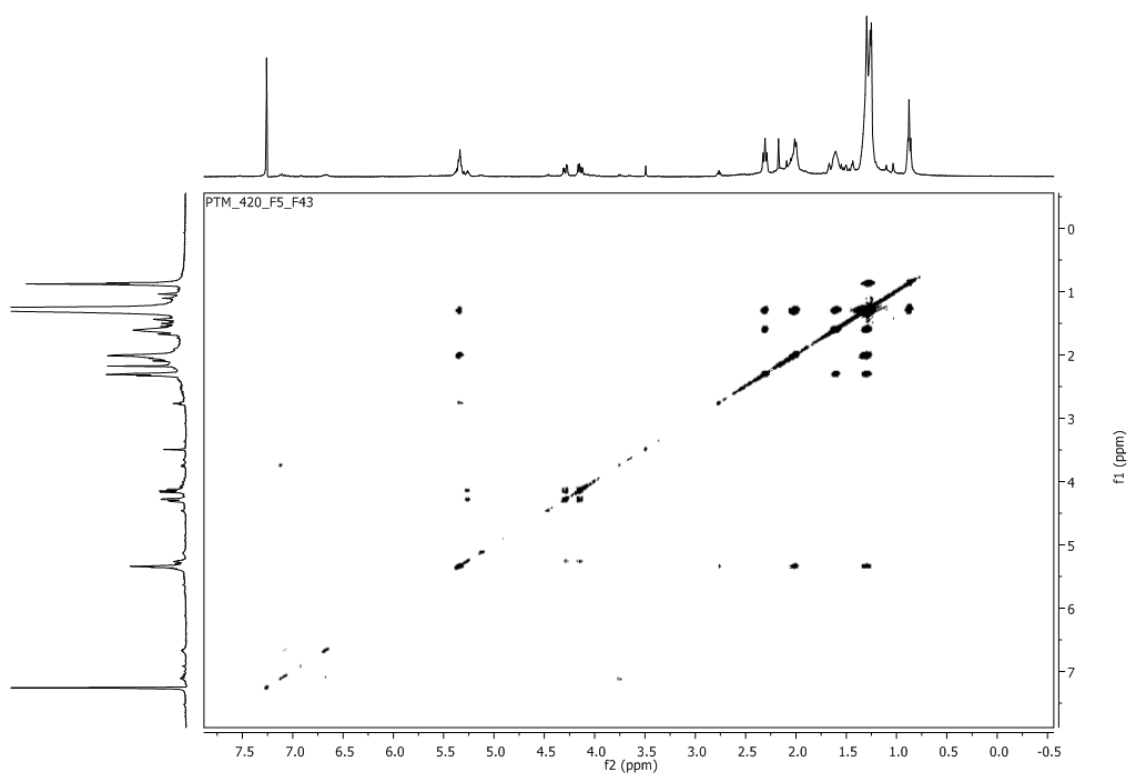
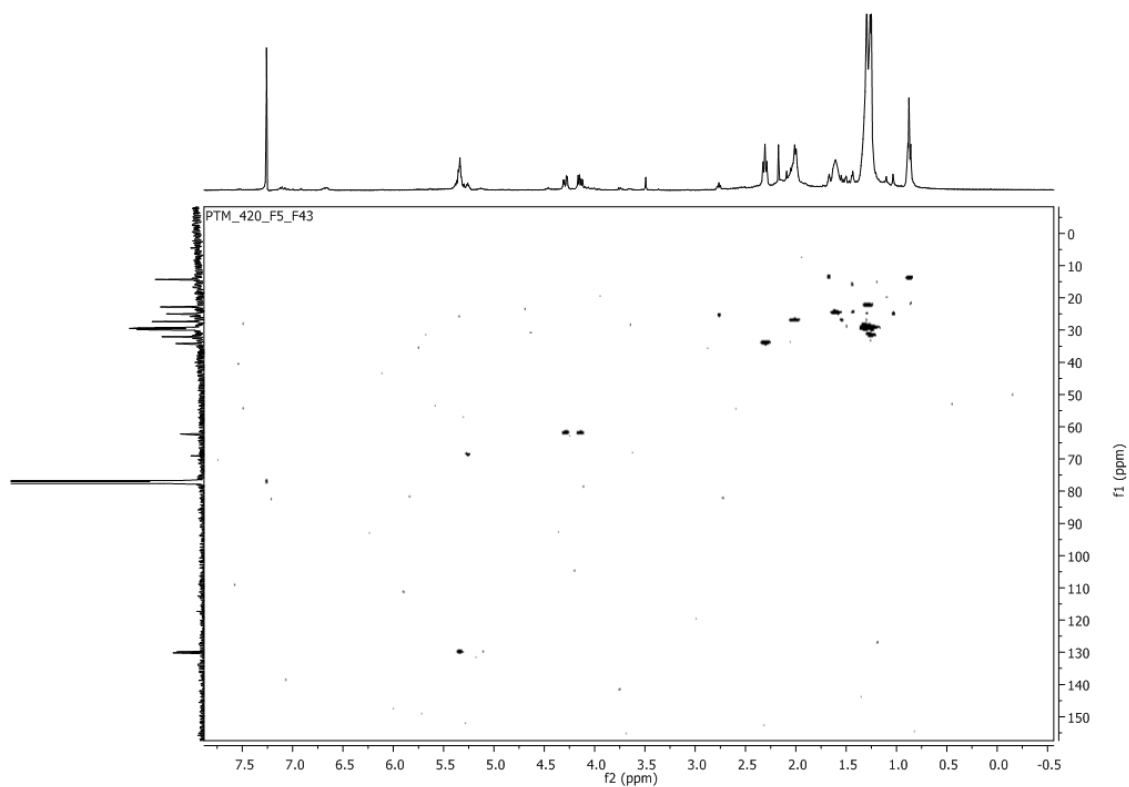
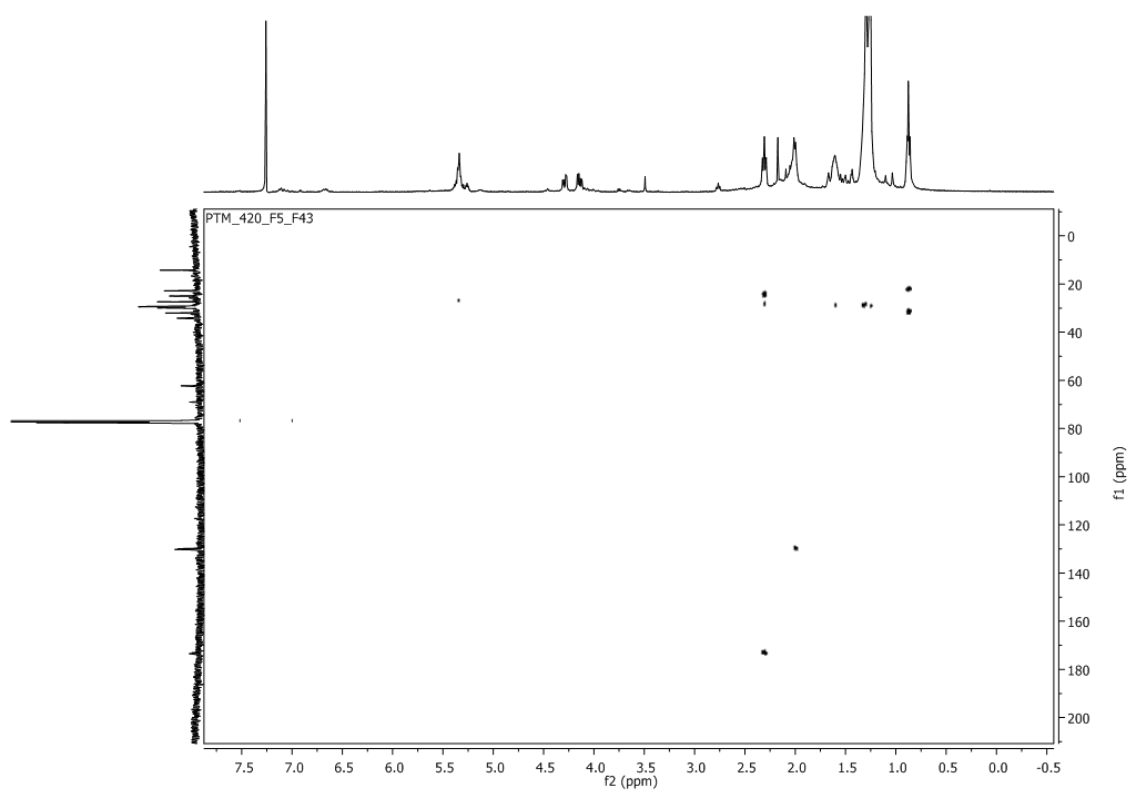
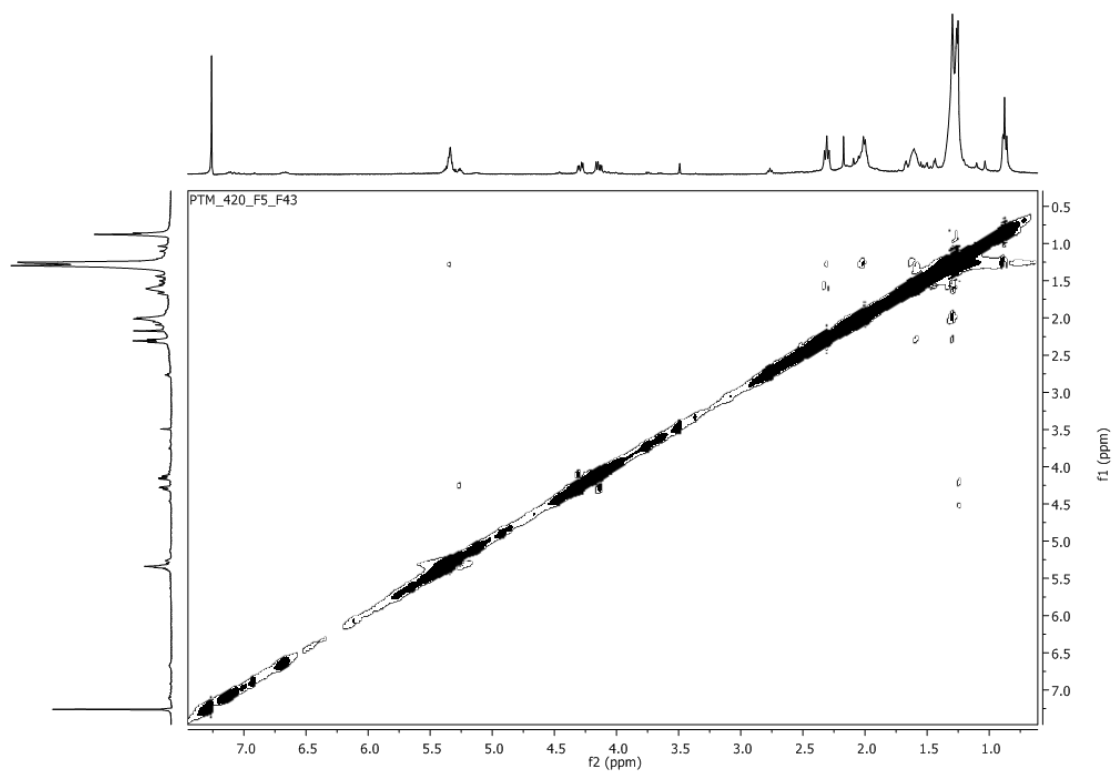


Figura vii-97 - Espectro COSY do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl_3

Figura vii-98 - Espectro TOCSY do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl_3 Figura vii-99 - Espectro HSQC do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl_3

Figura vii-100 - Espectro HMBC do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl_3 Figura vii-101 - Espectro NOESY do composto PTM-420-F5-F43, em CDCl_3

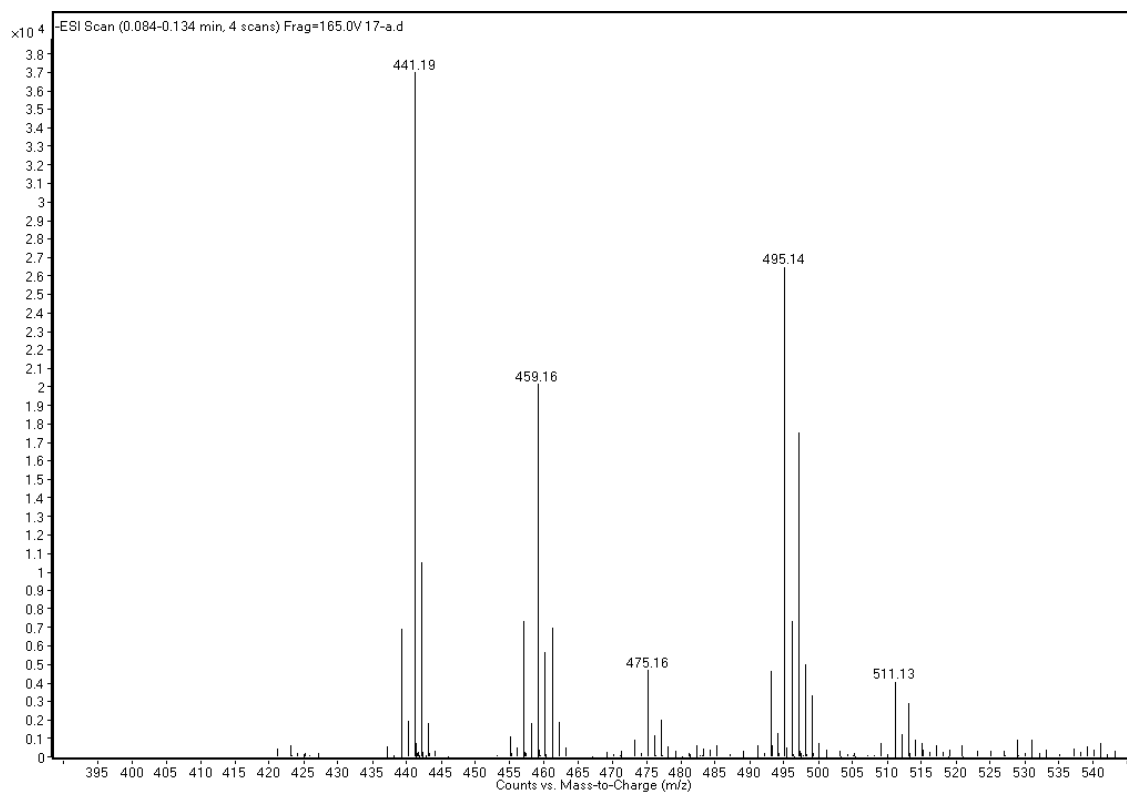
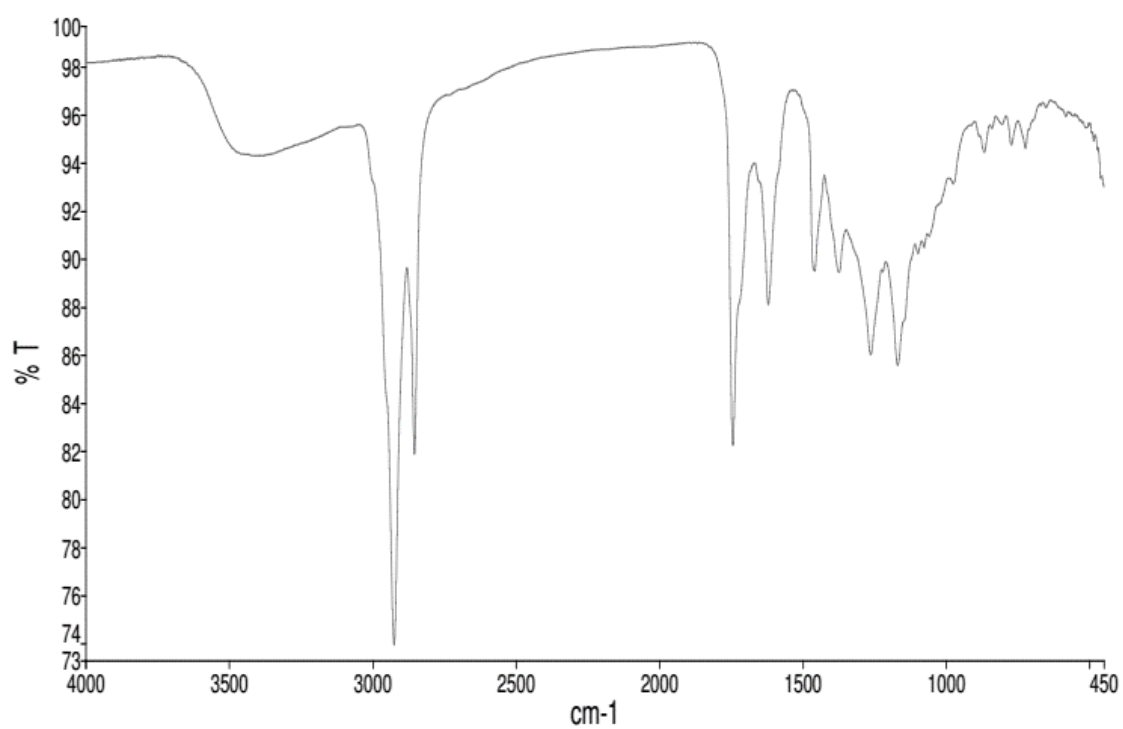


Figura vii-102 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F43

Figura vii-103 - Espectro IV do composto PTM-420-F5-F43, em CHCl_3

13. ESPECTROS PTM-420-F5-F44

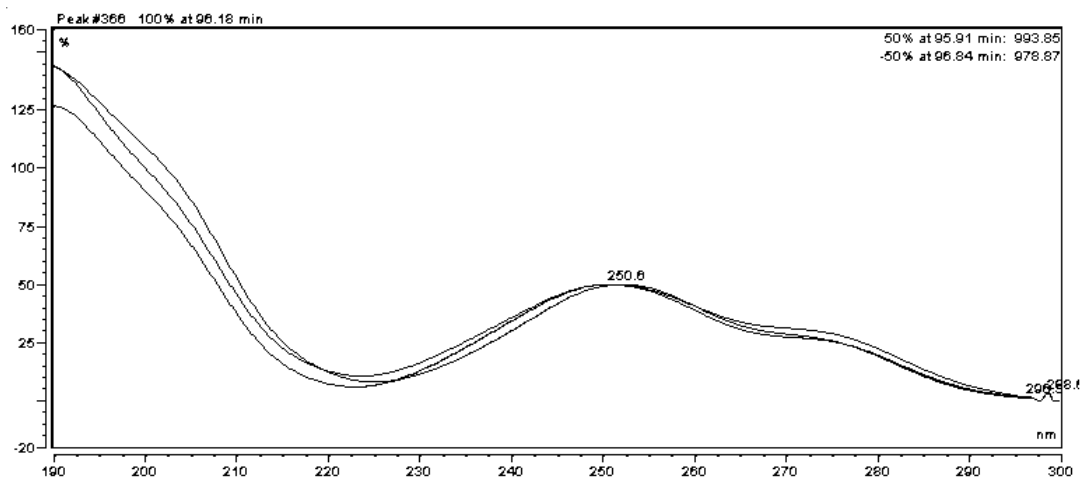


Figura vii-104 – Perfil UV do composto PTM-420-F5-F44

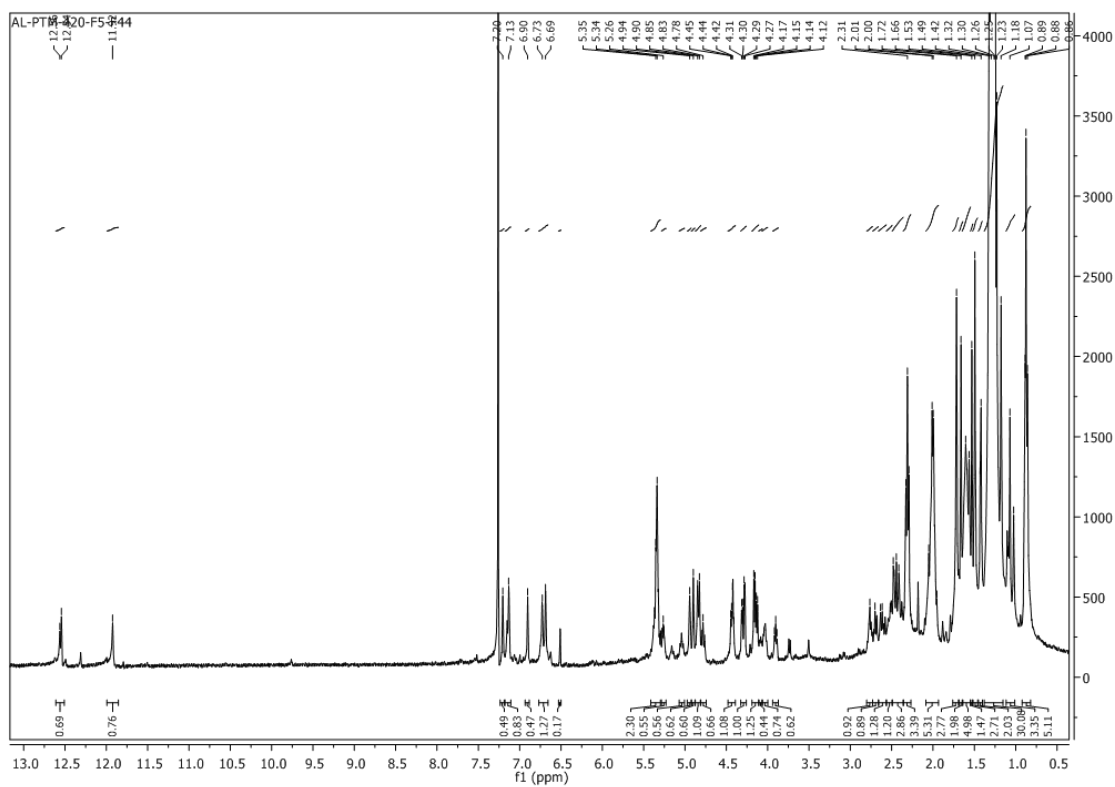


Figura vii-105 – Espectro ^1H composto PTM-420-F5-F44, em CHCl_3

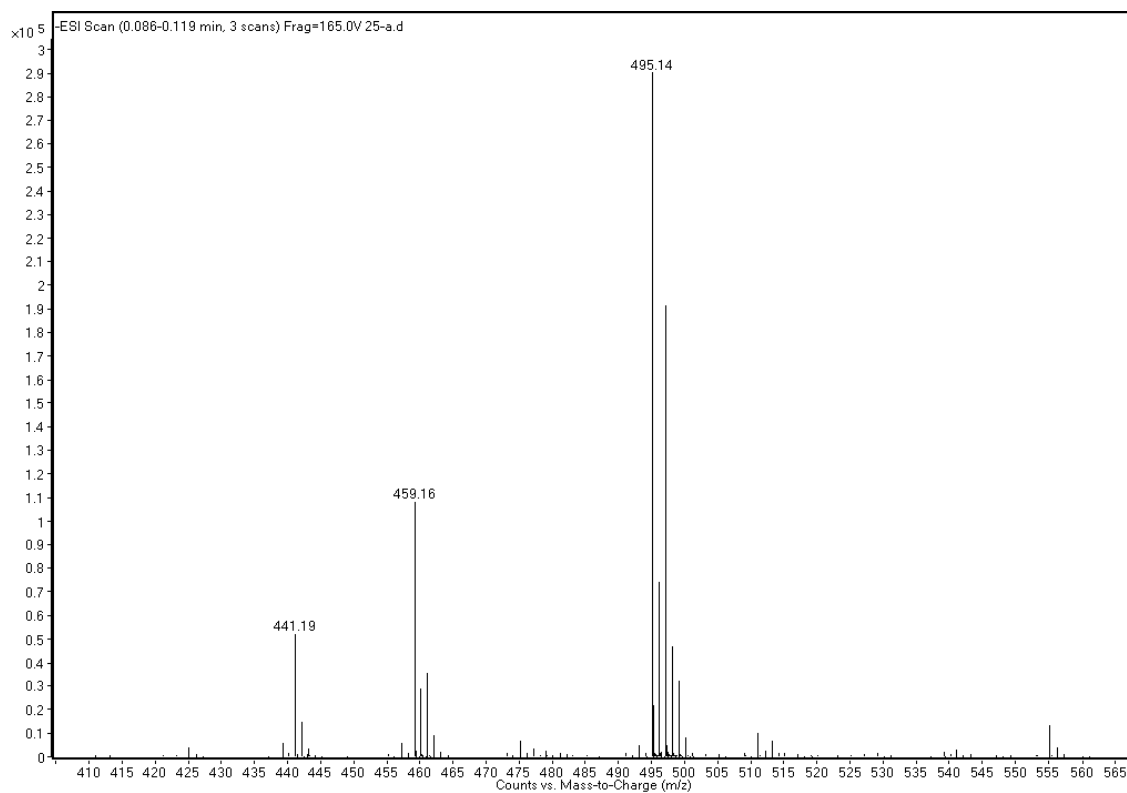
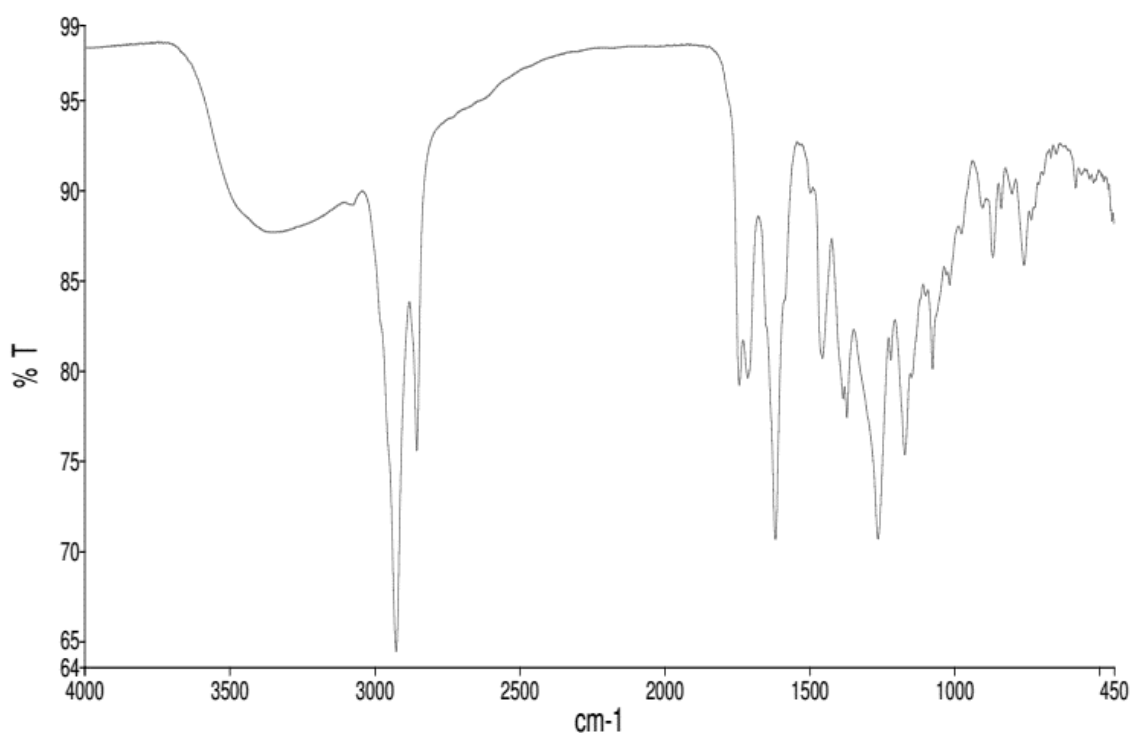


Figura vii-106 – Espectro HR-ESI-MS composto PTM-420-F5-F44

Figura vii-107 – Espectro IV composto PTM-420-F5-F44, em CHCl₃

14. ESPECTROS PTM-420-F5-F45

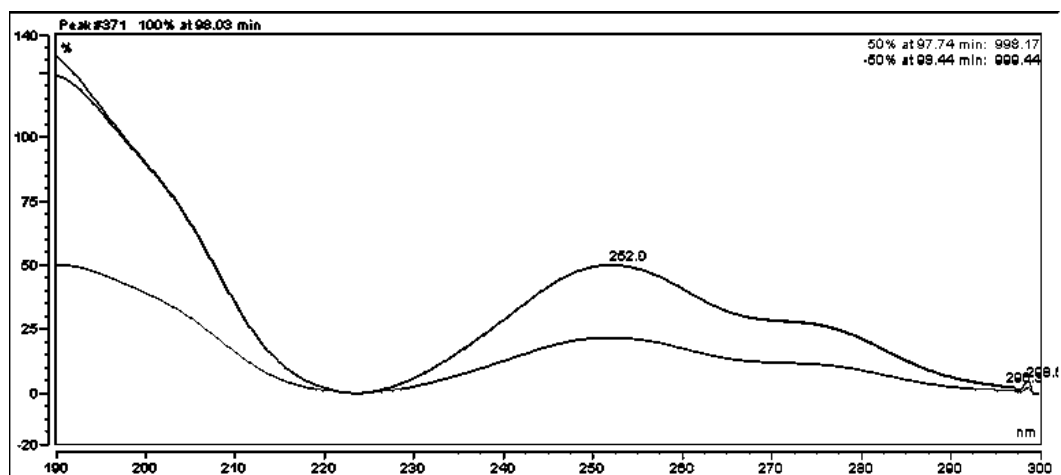
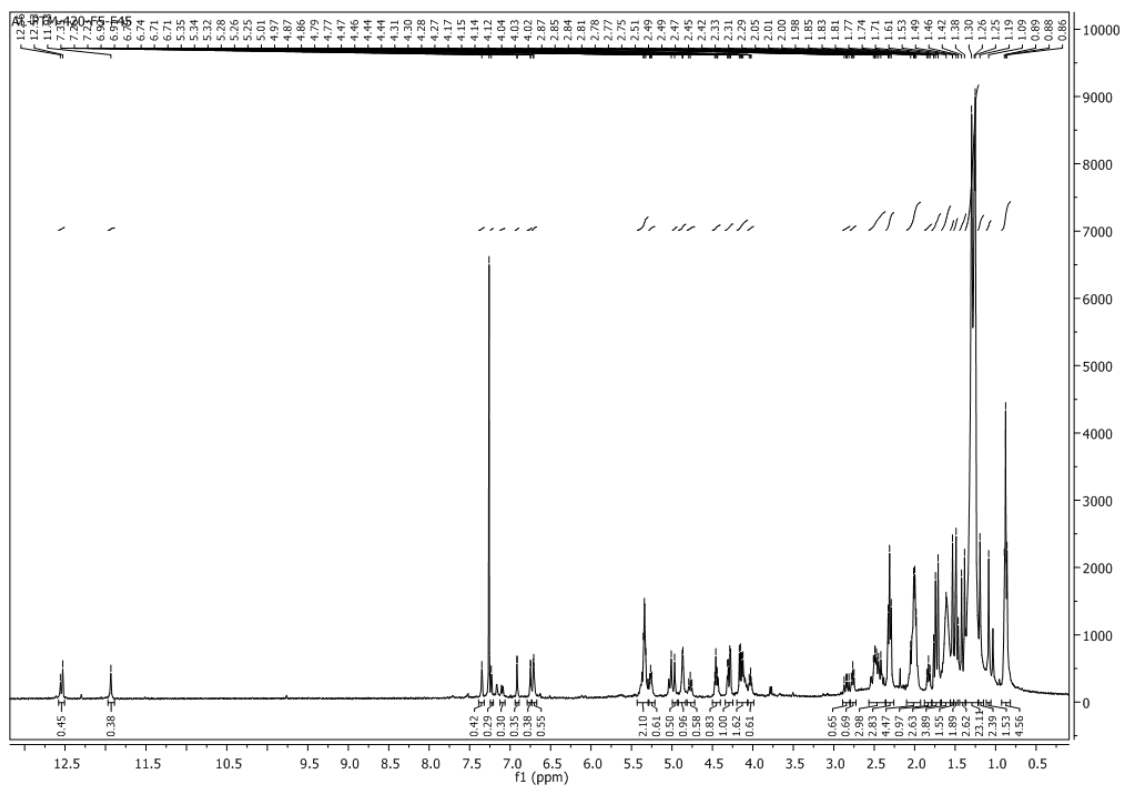


Figura vii-108 – Perfil UV do composto PTM-420-F5-F45

Figura vii-109 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F45, em CDCl_3

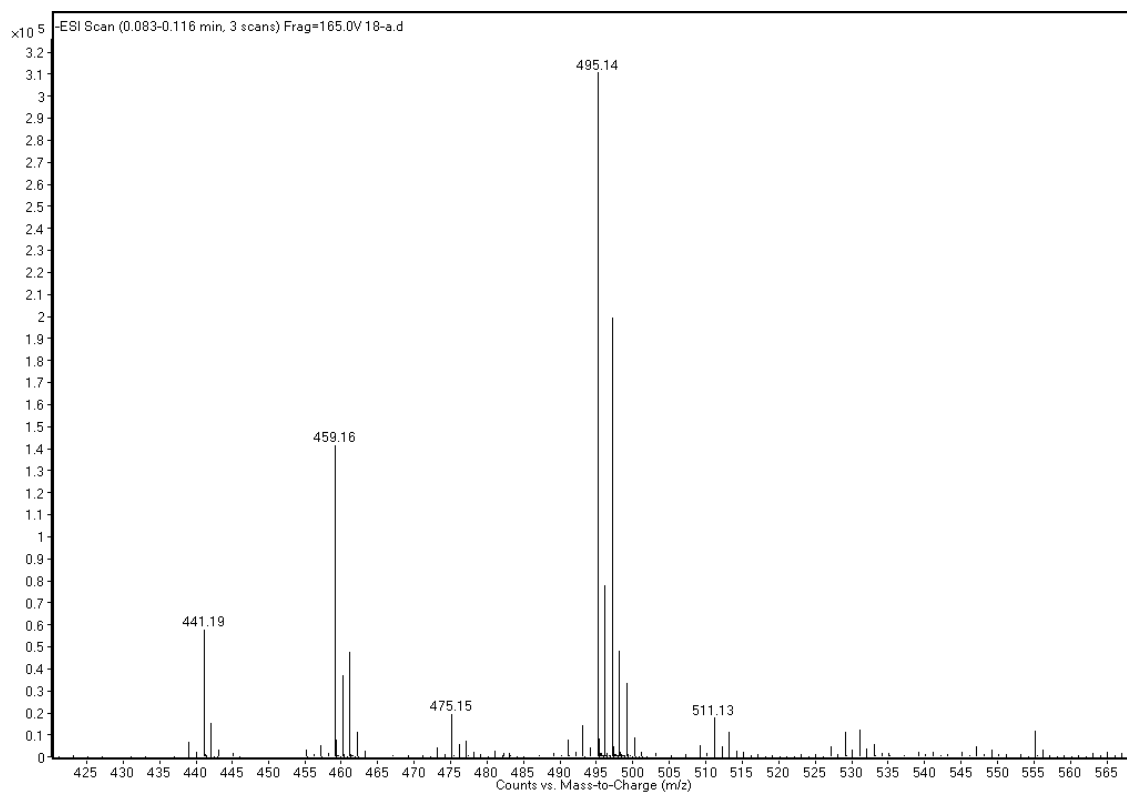


Figura vii-110 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F45, em CDCl_3

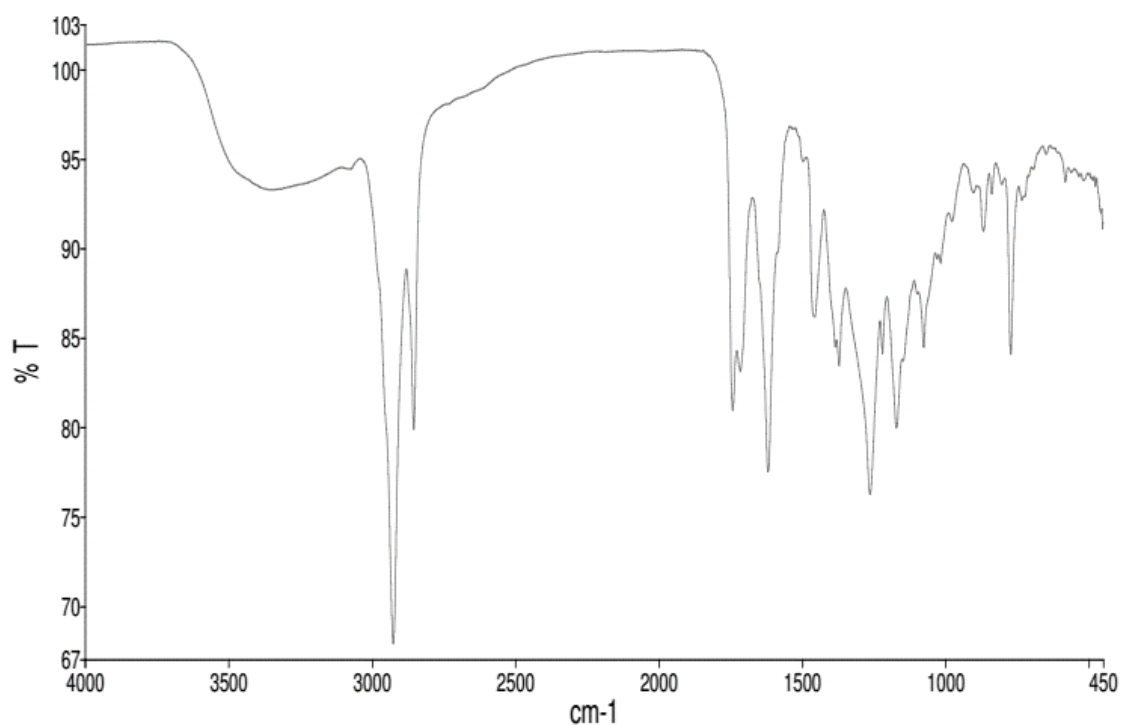


FIGURA VII-111 - ESPECTRO IV DO COMPOSTO PTM-420-F5-F45, EM CDCl_3

15. ESPECTROS PTM-420-F5-F47

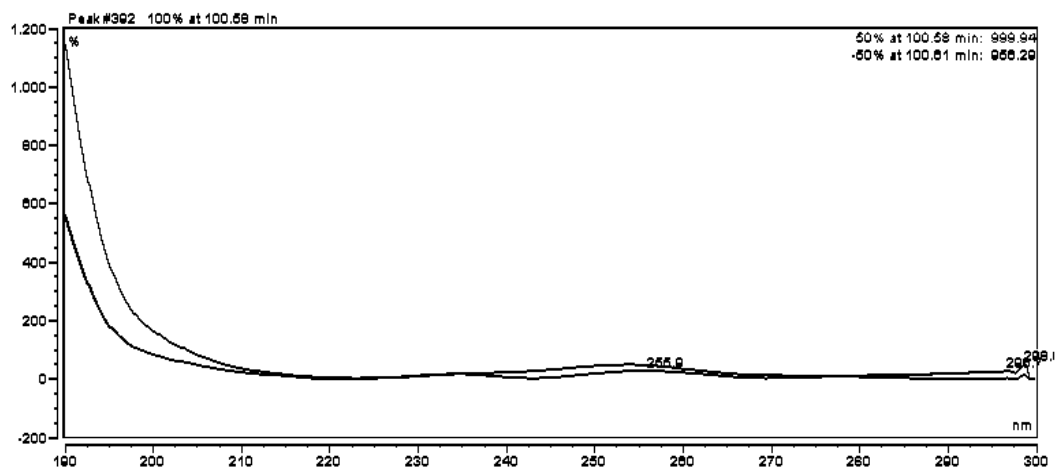


Figura vii-112 - Perfil UV do composto PTM-420-F5-F47

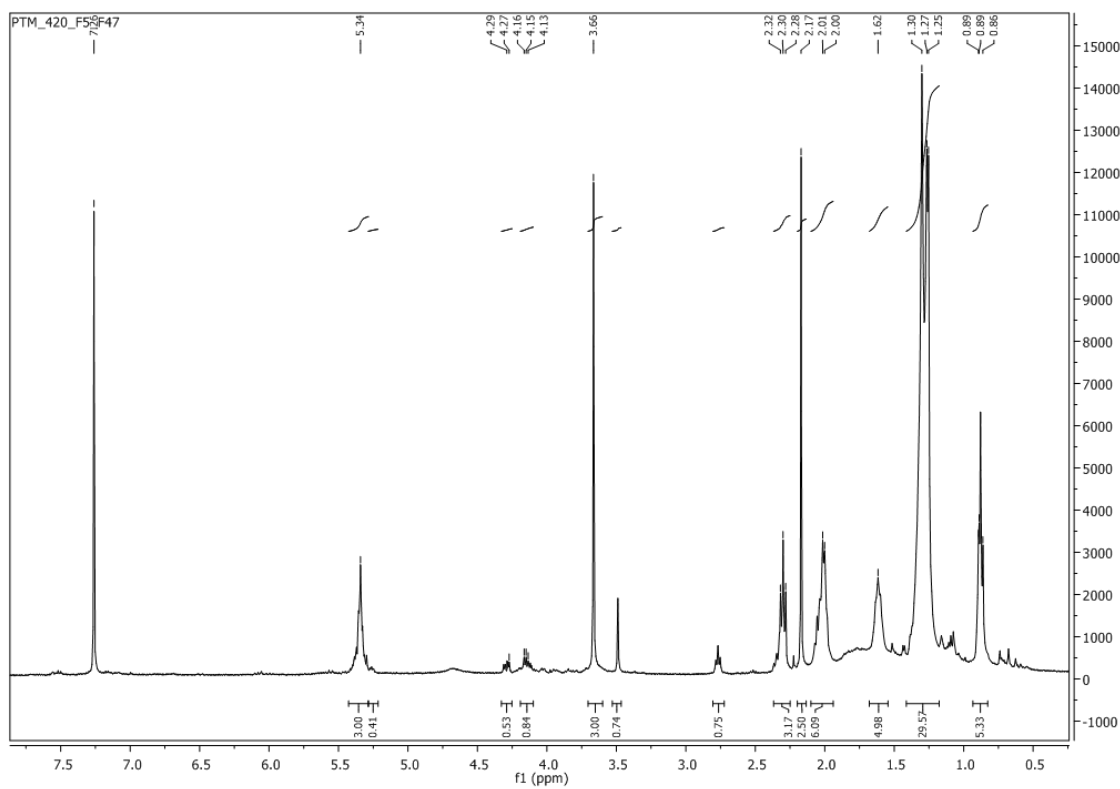


Figura vii-113 – Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F47, em CDCl_3

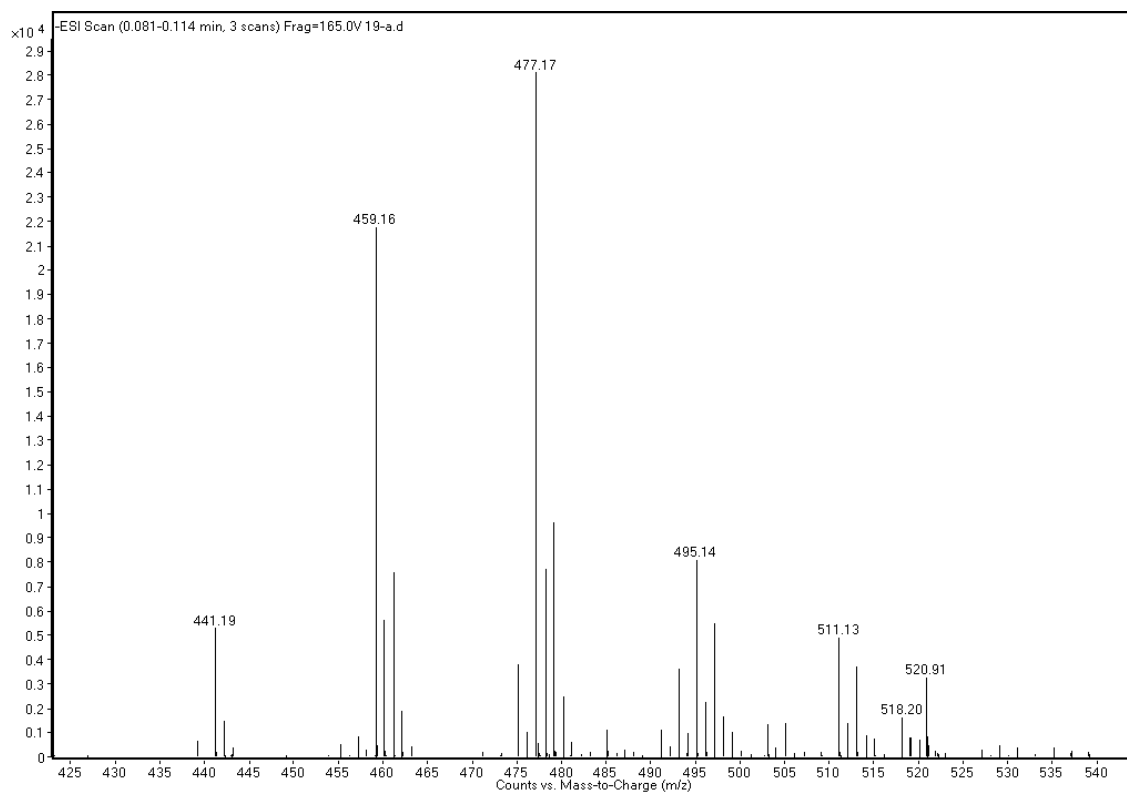


Figura vii-114 - Espectro HR-ESI-MS do composto PTM-420-F5-F47

16. CROMATOGRAMA PTM-420-F5, 2º. CRUDE

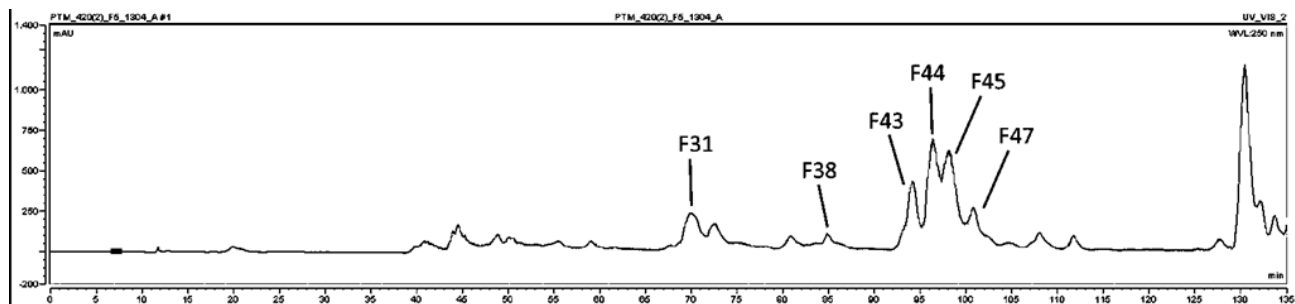


Figura vii-115 – Perfil cromatográfico da Fração F5, 2º. crude

17. ESPECTROS PTM-420-F5, 2º. CRUDE

17.1. COMPOSTO PTM-420-F5-F31(2)

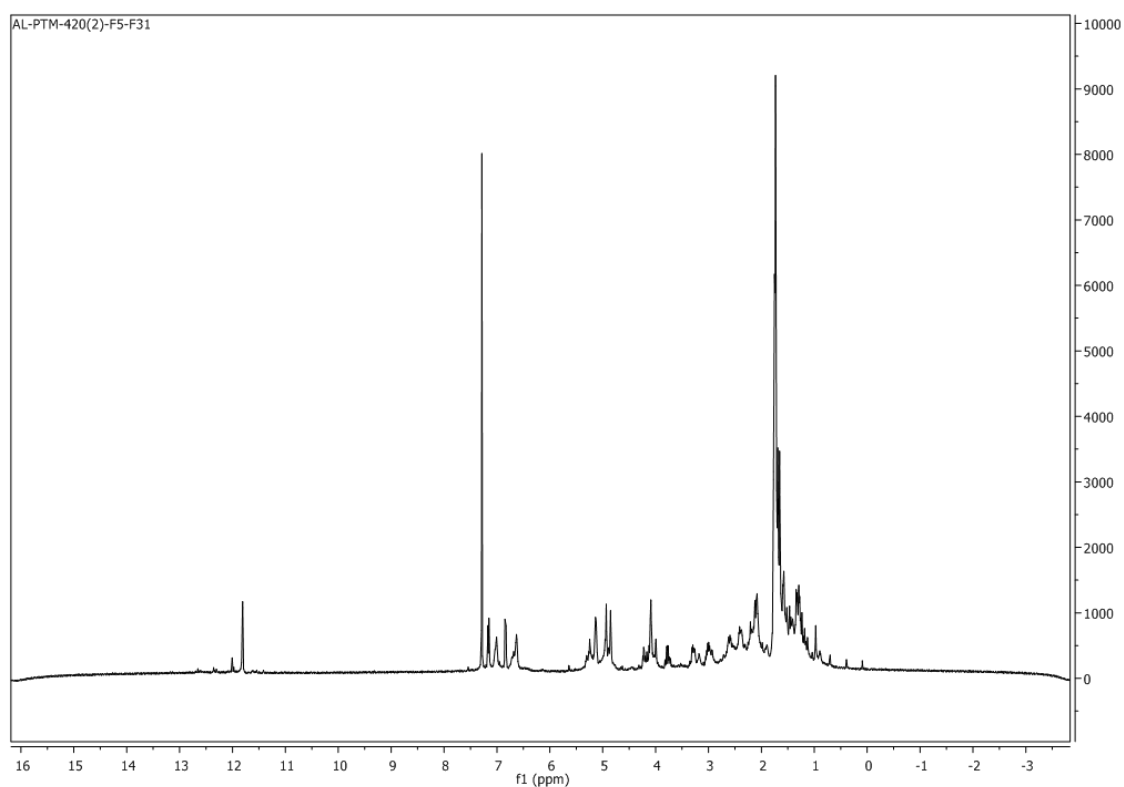


Figura vii-116 - Espectro ¹H do composto PTM-420-F5-F31, 2º. crude

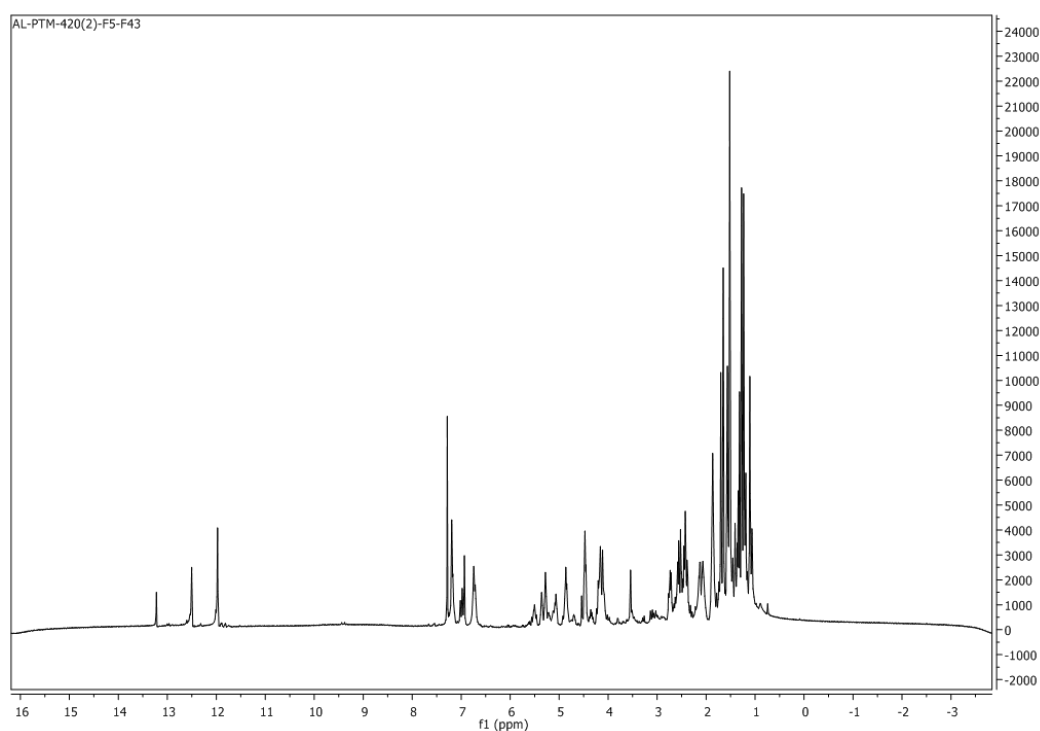
17.2. COMPOSTO PTM-420-F5-F43(2)

Figura vii-117 - Espectro ^1H do composto PTM-420-F5-F43, 2°. crude

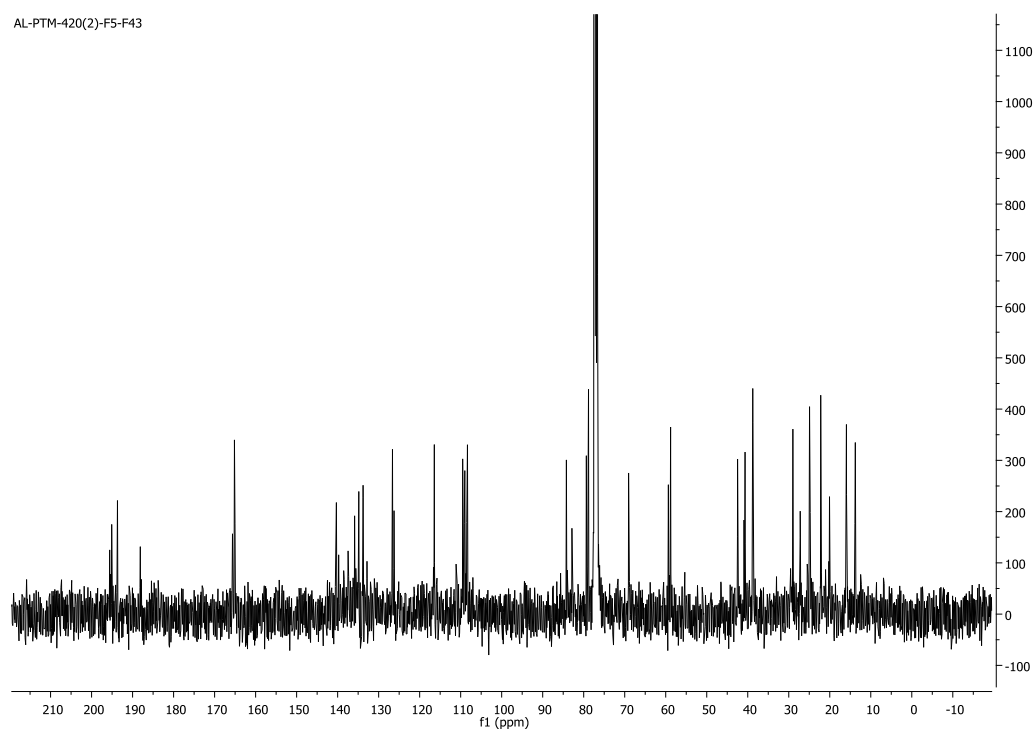


Figura vii-118 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F5-F43, 2°. Crude

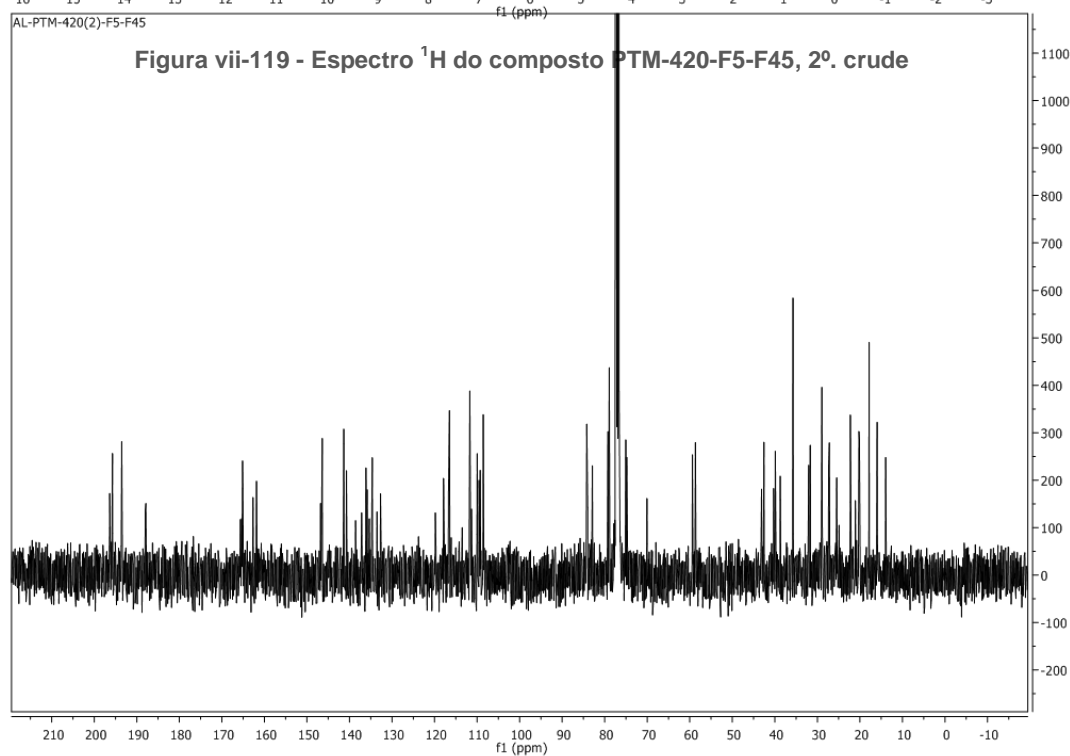
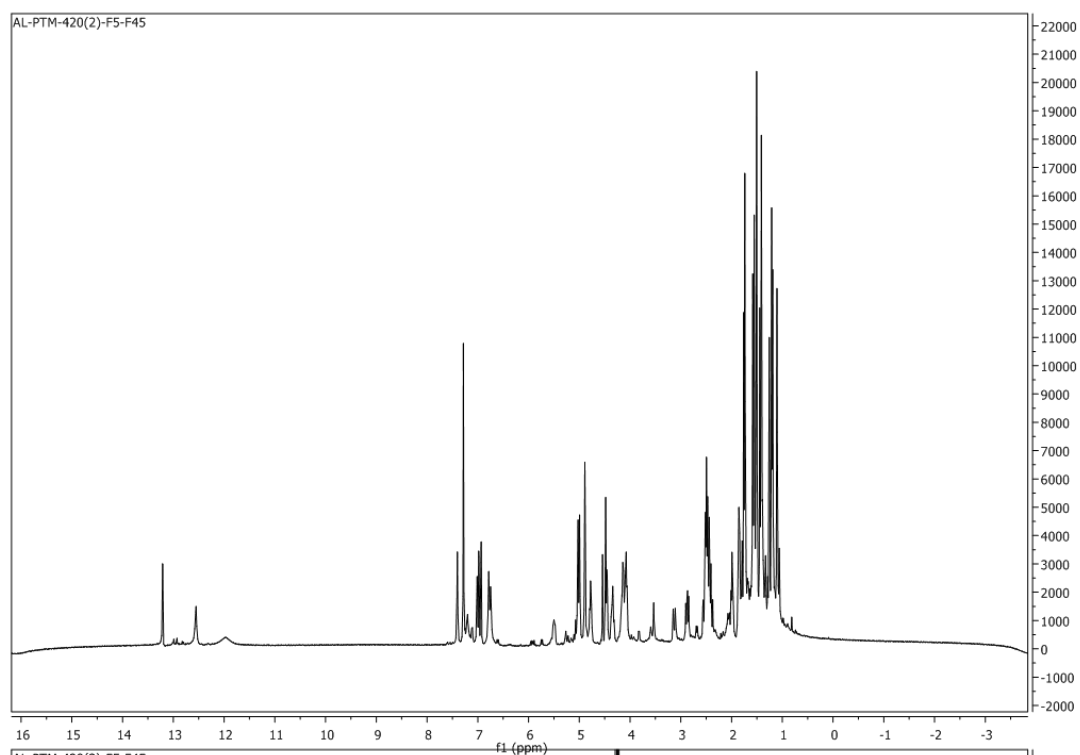
17.3. COMPOSTO PTM-420-F5-F45(2)

Figura vii-120 - Espectro ^{13}C do composto PTM-420-F5-F45, 2° crude